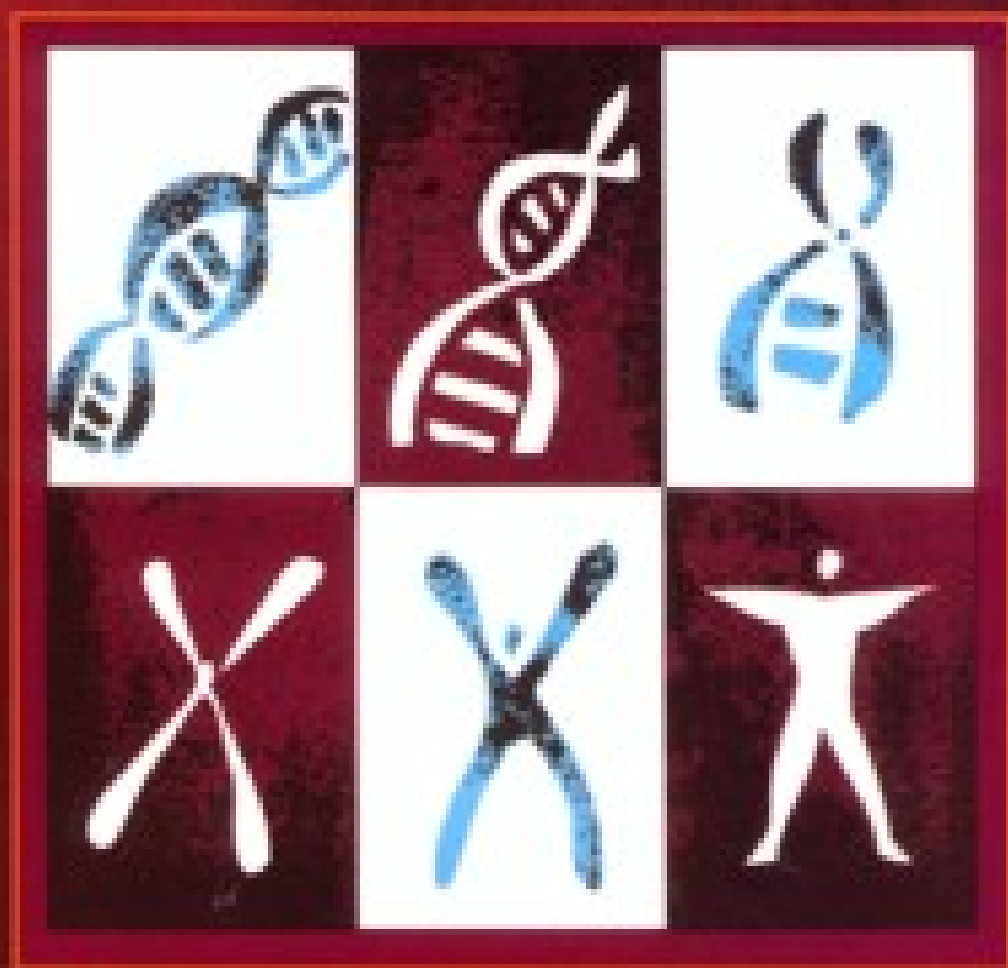
THOMPSON & THOMPSON

GENÉTICA MÉDICA

NUSSBAUM · McINNES · WILLARD

Sexta
6
Edição

Prefácio

Em seu prefácio da primeira edição do *Genética Médica*, publicado há 35 anos, James e Margaret Thompson escreveram

> A genética é fundamental para as ciências básicas da educação médica pré-clínica, e tem importantes aplicações para a medicina clínica, saúde pública e pesquisa médica. Com o reconhecimento do papel da genética na medicina, surgiu o problema de achar um lugar para ela no currículo de graduação, um problema que só foi resolvido parcialmente na maioria das escolas médicas. Este livro foi escrito para introduzir o estudante de medicina nos princípios da genética aplicada à medicina, e oferecer-lhes uma base para a abordagem da extensa e aceleradamente crescente literatura no campo. Caso seus colegas graduados também o considerem útil, ficaremos duplamente satisfeitos.

O que era antes verdade agora o é mais ainda, à medida que nossos conhecimentos de genética e do genoma vêm rapidamente se tornando uma parte integral da saúde pública e da prática médica. Esta nova edição do *Genética Médica*, a sexta da série, tem a mesma meta que as cinco anteriores: fornecer uma exposição precisa dos fundamentos da genética humana, com ênfase nos genes e mecanismos moleculares que operam nas doenças humanas. Os conceitos apresentados neste texto são ilustrados com exemplos tirados da medicina. Uma característica adicional nova desta edição do *Genética Médica* é um conjunto de casos destinados a demonstrar e reforçar os princípios da herança, patogenia, diagnóstico, tratamento e informação genética das doenças. O livro não pretende ser um compêndio de doenças genéticas, nem um tratado enciclopédico de genética humana em geral. Ao contrário, os autores esperam que a sexta edição do *Genética Médica* forneça aos estudantes um arcabouço para compreenderem o campo da genética médica, oferecendo-lhes, ao mesmo tempo, uma base sobre a qual estabelecer um programa de educação continuada nessa área. Qualquer médico ou estudante de consulta (*counseling*) genética, em curso avançado de graduação, graduado em genética, residente em qualquer campo da clínica médica, médico generalista ou das áreas médicas de enfermagem ou fisioterapia, pode encontrar neste livro uma apresentação não-exaustiva dos fundamentos da genética humana aplicada à saúde e à doença.

ROBERT L. NUSSBAUM, MD
RODERICK R. MCINNES, MD, PhD
HUNTINGTON F. WILLARD, PhD

Agradecimentos

Os autores desejam expressar seu apreço e gratidão aos muitos colegas que, com suas idéias, sugestões e críticas, contribuíram para melhorar esta edição revisada do *Genética Médica*. Em particular somos gratos a Gregory Barsh, da Stanford University School of Medicine, por sua extraordinária contribuição ao Cap. 17, Aspectos Genéticos do Desenvolvimento, e a Cheryl Shuman e Riyana Babul, do The Hospital for Sick Children, em Toronto, pela ajuda no Cap. 18, Diagnóstico Pré-natal. Também agradecemos a Donald Hadley e Sara Hull, do National Human Genome Research Institute; Richard Spielman, da University of Pennsylvania; Terry Hassold, Pat Hunt e Stuart Schwartz, do Case Western Reserve School of Medicine; Eric Fearon, da University of Michigan; David Ledbetter, da University of Chicago; Huda Zoghbi e Lisa Shaffer, do Baylor College of Medicine; George Stamatoyannopoulos e Peter Byers, da University of Washington; Aravinda Chakravarti, David Valle e Garry Cutting, do Johns Hopkins School of Medicine; Mark Kay, da Stanford University; Michael Hershfield, da Duke University; Charles Scriver e Paula Waters, da McGill University; Alex Levine, Joe Clarke, David Chitayet, Peter Ray e Donald Mahuran, do The Hospital for Sick Children, Toronto; Ants Toi, da University Health Network, Princess Margaret Hospital, Toronto; Peter St. George-Hyslop, da University of Toronto; Joseph Goldstein, da University of Texas Southwestern Medical Center; Robert Desnick, da Mount Sinai School of Medicine, New York; Diane Cox, da University of Alberta; e Douglas C. Wallace e John M. Shoffner, da Emory University.

Os mais profundos agradecimentos a nossa colega e amiga Dra. Margaret Thompson, não só por sua ajuda em rever o material, mas também por sua confiança e orientação durante o processo de revisão. Finalmente, agradecemos a nossas famílias por sua paciência e compreensão durante as muitas horas de trabalho consumidas na sexta edição do *Genética Médica*.

Introdução

O PAPEL DA GENÉTICA NA MEDICINA

Genética como uma Especialidade Médica

Esta é uma época especialmente estimulante na genética médica e humana. A genética médica atingiu um papel reconhecido como *a* especialidade da medicina que lida com o diagnóstico, o tratamento e o controle dos distúrbios hereditários. A idéia de que a genética médica está envolvida apenas com a herança de características triviais, superficiais e raras cedeu lugar à compreensão do papel fundamental do **gene** nos processos básicos da vida. Os geneticistas médicos e humanos estão na fronteira das investigações da variabilidade e da hereditariedade humana, enquanto também participam e se beneficiam do rápido progresso da biologia molecular, da bioquímica e da biologia celular. Em particular, a última década do século XX e o começo do século XXI presenciaram o início do **Projeto do Genoma Humano**, um esforço internacional para determinar o conteúdo completo do genoma humano, definido simplesmente como a soma total das informações genéticas de nossa espécie, codificadas dentro de cada célula nucleada do corpo. Em parceria com todas as outras disciplinas da biologia moderna, o Projeto do Genoma Humano já está revolucionando a genética médica e humana, fornecendo a compreensão de muitas doenças e promovendo o desenvolvimento de meios muito melhores de diagnóstico, medidas preventivas e métodos terapêuticos em um futuro próximo. Quando o Projeto do Genoma Humano estiver completo, ele possibilitará o conhecimento da seqüência completa de todo o DNA humano. O conhecimento da seqüência completa permitirá, por sua vez, a identificação de todos os genes humanos e, finalmente, possibilitará a determinação de como as variações nestes genes contribuem para a saúde e a doença.

Relevância da Genética para Toda a Prática Médica

Embora a genética médica tenha se tornado uma especialidade reconhecida, também ficou bastante claro que a genética humana fornece conceitos unificadores importantes que iluminam e unificam toda a prática médica. Para dar aos pacientes e a suas famílias o benefício total do conhecimento genético em expansão, todos os médicos e seus colegas da área de saúde precisam compreender os princípios subjacentes da genética humana. A existência de formas alternativas de um gene (**alelos**) na população; a ocorrência de **fenótipos** similares que se desenvolvem da mutação e da variação em loci diferentes; a importância das interações gene-gene e gene-ambiente nas doenças; o papel das mutações somáticas no câncer e no envelhecimento; a exiqüibilidade do diagnóstico pré-natal, dos testes pré-sintomáticos e da triagem populacional e a promessa de poderosas terapias gênicas são conceitos que hoje permeiam toda a prática médica e ficarão cada vez mais importantes no futuro. Assim, os fundamentos e os enfoques da genética não se restringem a nenhuma subespecialidade única da medicina.

Um aspecto da prática da genética médica relevante para toda a medicina merece ênfase especial: ele enfoca não só o paciente, mas também toda a família. Uma boa história familiar é uma primeira etapa importante na análise de qualquer distúrbio, seja ele genético ou não. Como destacou Childs, "não obter uma boa história familiar é uma medicina ruim ..." Uma história familiar é importante porque ela pode ser crucial no diagnóstico, pode mostrar que um distúrbio é hereditário, pode dar informações sobre a história natural de uma doença e a variação em sua expressão e pode esclarecer o padrão de herança. O diagnóstico de uma condição hereditária permite que o risco seja avaliado para outros membros da família, de modo que a conduta apropriada, a prevenção e a informação sejam oferecidas ao paciente *e* sua família.

Disciplinas dentro da Genética Médica e Humana

A **genética** é um tema diverso, envolvido com a variação e a hereditariedade em todos os organismos vivos. Dentro deste amplo campo, a **genética humana** é a ciência da variação e da hereditariedade dos seres humanos, enquanto a **genética médica** lida com o subgrupo da variação genética humana que tem significado na prática da medicina e na pesquisa médica.

Dentro da genética humana e médica, existem muitos campos de interesse, como indicado pelas várias direções nas quais a genética tem se desenvolvido. As principais áreas reconhecidas de especialização são o estudo dos cromossomos (**citogenética**); o estudo da estrutura e da função de genes individuais (**genética molecular e bioquímica**); o estudo do genoma, sua organização e seu funcionamento (**genômica**); o estudo da variação genética nas populações humanas e os fatores que determinam as freqüências alélicas (**genética de populações**); o estudo do controle genético do desenvolvimento (**genética do desenvolvimento**) e a aplicação da genética ao diagnóstico e aos cuidados do paciente (**genética clínica**). O significado literal de *clínica é à beira do leito* (*klinikos*, do grego "ao lado do leito"), e um geneticista clínico é um médico geneticista apropriadamente

qualificado que está envolvido de forma direta no diagnóstico de doenças genéticas e nos cuidados dos pacientes com tais doenças. A **consulta genética***, que combina o fornecimento da informação sobre o risco com o suporte psicológico e educacional, amadureceu para uma nova profissão de saúde, com toda uma equipe de profissionais de genética dedicados aos cuidados dos pacientes e suas famílias.

Além do contato direto com o paciente, o médico geneticista fornece cuidados às pessoas, por meio de diagnósticos laboratoriais, e à população em geral, por meio de programas de triagem destinados a identificar pessoas em risco de desenvolver ou transmitir uma doença genética. O diagnóstico de uma doença genética em pacientes, testes de portador, diagnóstico pré-natal e a identificação de pessoas em risco de desenvolver uma doença mais tarde na vida são especialidades em rápida expansão nos laboratórios clínicos. A triagem populacional de doenças genéticas também está se tornando cada vez mais difundida.

CLASSIFICAÇÃO DOS DISTÚRBIOS GENÉTICOS

Na prática clínica, o principal significado da genética é no esclarecimento do papel da variação genética e da mutação na etiologia de um grande número de distúrbios. Absolutamente qualquer doença é o resultado da ação combinada dos genes e do ambiente, mas o papel relativo do componente genético pode ser grande ou pequeno.

Entre os distúrbios causados total ou parcialmente por fatores genéticos, são reconhecidos três tipos principais.

1. Distúrbios monogênicos
2. Distúrbios cromossômicos
3. Distúrbios multifatoriais

Os **distúrbios monogênicos** são causados por genes mutantes individuais. A mutação pode estar presente em apenas um cromossomo de um par (com um alelo normal no cromossomo homólogo) ou em ambos os cromossomos do par. Em alguns casos, a mutação é no genoma mitocondrial, e não no nuclear. Em qualquer caso, a causa é um erro crítico na informação genética levada por um único gene. Os distúrbios monogênicos em geral exibem padrões de heredograma óbvios e característicos. A maioria destes defeitos é rara, com uma freqüência que pode ser tão alta quanto 1 em 500, mas em geral é muito menor. Embora individualmente raros, os distúrbios monogênicos como um grupo, são responsáveis por uma proporção significativa de doenças e mortes. Considerando a população como um todo, os distúrbios monogênicos afetam 2% da população durante todo o tempo de vida. Em um estudo populacional de mais de 1 milhão de crianças nascidas vivas, a incidência de graves distúrbios monogênicos na população pediátrica foi estimada como sendo de 0,36%; entre as crianças hospitalizadas, de 6% a 8% provavelmente têm distúrbios monogênicos.

Nos **distúrbios cromossômicos**, o defeito não se deve a um único erro no código genético, mas a um excesso ou a uma deficiência dos genes contidos em cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos. Por exemplo, a presença de uma cópia extra de um cromossomo 21 produz um distúrbio específico, a síndrome de Down, muito embora nenhum gene individual no cromossomo seja anormal. Como um grupo, os distúrbios cromossômicos são bem comuns, afetando cerca de 7 em cada 1.000 crianças nascidas vivas, e contribuindo com cerca de metade de todos os abortos espontâneos de primeiro trimestre.

A **herança multifatorial** é responsável por vários distúrbios do desenvolvimento que resultam em malformações congênitas e muitos distúrbios comuns da vida adulta. Parece não haver um erro único na informação genética em muitas destas condições. A doença resulta de uma combinação de pequenas variações nos genes que juntas podem produzir ou predispor a um grave defeito, em geral em conjunto com fatores ambientais. Os distúrbios multifatoriais tendem a recorrer nas famílias, mas não apresentam os padrões característicos de heredogramas de características monogênicas. As estimativas do impacto da doença multifatorial variam de 5% na população pediátrica até mais de 60% na população toda.

CONTINUIDADE

Durante os 40 anos de vida profissional dos atuais estudantes de medicina e de consulta genética, grandes mudanças provavelmente ocorrerão na avaliação — e na atividade — do papel da genética na medicina. É difícil imaginar que qualquer período possa englobar mudanças maiores que as vistas nos últimos 50 anos, durante os quais o campo foi desde o primeiro reconhecimento da identidade do DNA como o agente ativo da herança até o descobrimento da estrutura molecular do DNA e dos cromossomos e a determinação do código completo do genoma humano. A julgar pelo passo acelerado das descobertas apenas na última década, é certo que estamos no começo de uma revolução na integração dos conhecimentos da genética e do genoma com a saúde pública e a prática da medicina.

Uma introdução à linguagem e aos conceitos da genética humana e médica e uma apreciação da perspectiva genética e genômica na saúde e na doença formarão uma estrutura para a aprendizagem duradora, que é parte de qualquer carreira de um profissional de saúde.

Referências Gerais

Childs B (1982) Genetics in the medical curriculum. Am J Med Genet 13:319–324.

King RA, Rotter JI, Motulsky AG (1992) The Genetic Basis of Common Diseases. Oxford University Press, Oxford, England.

McKusick VA (1998) Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-Linked Phenotypes, 12th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore. See online version at *http://www3.ncbi.nlm.nih.gov*.

Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (1997) Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) (2000) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Vogel F, Motulsky AG (1997) Human Genetics: Problems and Approaches, 3rd ed. Springer-Verlag, New York

*N.T.: O termo *counseling* será traduzido como consulta em todo o livro, pois não são dados conselhos, mas sim informações, cabendo ao casal tomar suas decisões uma vez que esteja bem-informado.

Bases Cromossômicas da Hereditariedade

A avaliação da importância da genética na medicina requer uma compreensão da natureza do material genético, de como ele é embalado no genoma humano e de como ele é transmitido de célula para célula durante a divisão celular e de geração para geração durante a reprodução. O genoma humano consiste em grandes quantidades de ácido desoxirribonucléico (**DNA**), que contém em sua estrutura a informação genética necessária para especificar todos os aspectos da embriogênese, do desenvolvimento, do crescimento, do metabolismo e da reprodução, ou seja, todos os aspectos que tornam o ser humano um organismo funcional. O genoma contém, pelas estimativas atuais, cerca de 50.000 **genes**, que a este ponto definiremos simplesmente como unidades de informação genética. Os genes são codificados no DNA que constitui organelas em forma de bastão chamadas **cromossomos** no núcleo de cada célula. A influência dos genes e da genética nos estados de saúde e doença é generalizada, e suas bases são as informações codificadas no DNA encontrado no genoma humano.

Dentro de cada célula, o genoma é embalado como **cromatina**, na qual o DNA forma um complexo com várias classes de proteínas cromossômicas. Algumas das proteínas encontradas na cromatina desempenham papéis estruturais, enquanto outras servem para regular a expressão de genes individuais. Exceto durante a divisão celular, a cromatina é distribuída pelo núcleo e é relativamente homogênea em aspecto ao microscópio. Quando uma célula se divide, entretanto, seu material nuclear condensa-se para se apresentar como cromossomos microscopicamente visíveis. Portanto, os cromossomos são visíveis como estruturas distintas apenas nas células em divisão, mas eles, no entanto, conservam sua integridade entre as divisões celulares.

Cada espécie tem um complemento cromossômico (**cariótipo**) característico em termos de número e morfologia de seus cromossomos. Os genes estão em ordem linear ao longo dos cromossomos, cada gene tendo uma posição exata ou **locus**. O **mapa gênico** é o mapa de localizações cromossômicas dos genes e também é característico de cada espécie e indivíduos dentro de uma espécie.

O estudo dos cromossomos, de sua estrutura e de sua herança é chamado de **citogenética**. A ciência da moderna citogenética humana data de 1956, quando Tjio e Levan desenvolveram técnicas efetivas de análise cromossômica e estabeleceram que o número normal de cromossomos humanos é 46. Desde esta época, muito se tem aprendido sobre os cromossomos humanos, sua estrutura normal, sua composição molecular, as localizações dos genes que eles contêm e suas numerosas e variadas anomalias.

A análise cromossômica tornou-se um importante procedimento diagnóstico em medicina clínica. Como será descrito mais amplamente nos capítulos subseqüentes, algumas destas aplicações incluem as seguintes:

Diagnóstico Clínico. Vários distúrbios médicos, incluindo alguns que são muito comuns, tais como a síndrome de Down, estão associados a mudanças microscopicamente visíveis no número ou na estrutura dos cromossomos e necessitam de uma análise cromossômica para diagnóstico e informação genética (ver Caps. 9 e 10).

Mapeamento Gênico. Uma meta importante da genética médica hoje em dia é o mapeamento de genes específicos em cromossomos como parte do Projeto do Genoma Humano. Este tópico será citado repetidamente, mas aparece discutido em detalhes no Cap. 8.

Citogenética do Câncer. As mudanças cromossômicas nas células somáticas estão envolvidas no início e na progressão de muitos tipos de câncer (ver Cap. 16).

Diagnóstico Pré-natal. A análise cromossômica é um procedimento essencial no diagnóstico pré-natal (ver Cap. 18).

A habilidade para interpretar um relato cromossômico e algum conhecimento da metodologia, do escopo e das limitações dos estudos cromossômicos são habilidades essenciais aos médicos e aos outros profissionais que trabalham com pacientes que têm defeitos de nascimento, retardo mental, distúrbios do desenvolvimento sexual e muitos tipos de câncer.

OS CROMOSSOMOS HUMANOS

Com exceção das células da linhagem germinativa, todas as células que contribuem para o nosso corpo são chamadas de **células somáticas** (*soma*, corpo). Os 46 cromossomos das células somáticas humanas constituem 23 pares. Destes 23 pares, 22 são similares em homens e mulheres e são chamados de **autossomos**, numerados em ordem decrescente do maior (cro-

mossomo 1) até o menor (cromossomos 21 e 22). O par restante constitui os **cromossomos sexuais**: XX nas mulheres e XY nos homens. Cada cromossomo possui um subgrupo diferente de genes que são dispostos linearmente ao longo de seu DNA. Os membros de um par de cromossomos (descritos como **cromossomos homólogos** ou **homólogos**) possuem informações genéticas similares, isto é, têm os mesmos genes, na mesma seqüência. Em um locus específico, entretanto, eles podem ser idênticos ou ter formas levemente diferentes do mesmo gene, chamados de **alelos**. Um membro de cada par de cromossomos é herdado do pai; o outro, da mãe. Normalmente, os membros de um par de autossomos são microscopicamente indistinguíveis um do outro. Nas mulheres, os cromossomos sexuais, os dois **cromossomos X**, são igualmente indistinguíveis. Nos homens, entretanto, os cromossomos sexuais diferem. Um é um X, idêntico aos X das mulheres, herdado por um homem de sua mãe e transmitido para suas filhas. O outro, o **cromossomo Y**, é herdado de seu pai e transmitido para seus filhos. No Cap. 10, veremos algumas exceções à regra simples e quase universal de que as mulheres são XX e os homens, XY.

Existem dois tipos de divisão celular: mitose e meiose. A **mitose** é a divisão comum das células somáticas, pela qual o corpo cresce, diferencia-se, e efetua a regeneração tissular.* A divisão mitótica normalmente resulta em duas células filhas, cada uma com cromossomos e genes idênticos aos da células parental. Podem ocorrer dúzias ou mesmo centenas de mitoses sucessivas em uma linhagem de células somáticas. Em contraste, a **meiose** só ocorre na linhagem germinativa. A meiose resulta na formação de células reprodutivas (**gametas**), cada uma das quais tem apenas 23 cromossomos: um de cada tipo de autossomo e um X ou um Y. Assim, enquanto as células somáticas têm o complemento cromossômico **diplóide** (*diploos*, duplo) ou o complemento 2n de cromossomos (46 cromossomos), os gametas têm o complemento **haplóide** (*haploos*, único) ou n de cromossomos (23 cromossomos). As anomalias de número ou estrutura de cromossomos, que em geral são clinicamente significativas, podem surgir ou em células somáticas ou na linhagem germinativa por erros na divisão celular.

O CICLO DE VIDA DE UMA CÉLULA SOMÁTICA

Um ser humano começa a vida como um ovócito fertilizado (**zigoto**), uma célula diplóide a partir da qual todas as células do corpo (estimadas em cerca de 100 trilhões) são derivadas, por meio de dezenas ou centenas de mitoses. A mitose obviamente é crucial para o crescimento e a diferenciação, mas ocupa apenas uma pequena parte do ciclo de vida de uma célula. O que ocorre na **intérfase**, o período entre duas mitoses sucessivas?

Como mostra a Fig. 2.1, a mitose é a mais curta das quatro fases do ciclo celular. Imediatamente após a mitose, a célula entra em uma fase chamada G_1, na qual não há síntese de DNA. Algumas células levam um longo tempo, dias ou mesmo anos, em G_1; outras passam por este estágio em horas. Embora os mecanismos moleculares que controlam a progressão do ciclo celular não sejam completamente conhecidos, o ciclo celular é controlado por uma série de **pontos de controle** (***checkpoints***) que determinam a duração de cada etapa na mitose. Além disso, os pontos de controle monitoram e controlam a precisão da síntese de DNA, bem como a montagem e a ligação de uma elaborada rede de microtúbulos que facilita o movimento dos cromossomos. Se for detectado um dano ao genoma, estes pontos de controle pararão a progressão do ciclo celular até que sejam feitos os reparos ou, se o dano for excessivo, até que a célula seja instruída a morrer pela morte celular programada (um processo chamado de **apoptose**).

*N.T.: Também existem mitoses na primeira fase da gametogênese masculina e feminina. Ver em meiose.

Fig. 2.1 Um ciclo celular mitótico típico, descrito no texto. São indicados os telômeros, o centrômero e as cromátides irmãs.

G_1 é seguido da **fase S**, o estágio de síntese de DNA. Durante este estágio, cada cromossomo, que em G_1 era uma única molécula de DNA (cuja estrutura exata examinaremos no Cap. 3), replica-se para se tornar um cromossomo bipartido que consiste em duas **cromátides irmãs** (ver Fig. 2.1), cada uma das quais contém uma cópia idêntica da molécula original linear de DNA. As pontas de cada cromossomo (ou cromátide) são marcadas por **telômeros**, que consistem em seqüências especializadas de DNA que garantem a integridade do cromossomo durante a divisão celular. As duas cromátides irmãs são mantidas fisicamente juntas no **centrômero**, uma região do DNA que se associa a várias proteínas específicas para formar o **cinetócoro**. Esta estrutura complexa serve para ligar cada cromossomo aos microtúbulos do fuso mitótico e para controlar o movimento cromossômico durante a mitose. A síntese de DNA durante a fase S é não-sincrônica em todos os cromossomos, ou mesmo dentro de um único cromossomo. Ao contrário, ao longo de cada cromossomo ela começa em centenas a milhares de pontos, chamados de **origens de replicação do DNA**. Os segmentos cromossômicos individuais têm seu próprio tempo característico de replicação durante as 6 a 8 horas da fase S.

Ao final da fase S, o conteúdo de DNA da célula dobrou, e a célula entra em um breve estágio seguinte, chamado G_2. Durante todo o ciclo celular, os ácidos ribonucleicos e as proteínas são produzidos, e a célula aumenta de modo gradual, eventualmente dobrando sua massa total antes da mitose seguinte. G_2 termina em mitose, que começa quando os cromossomos individuais iniciam um condensamento e tornam-se visíveis ao microscópio como filamentos finos e longos, um processo que será considerado em maiores detalhes na seção seguinte e no Cap. 3.

As fases G_1, S e G_2 juntas constituem a intérfase. Nas células humanas com divisão típica, as três fases levam um total de 16 a 24 horas, enquanto a mitose dura apenas de 1 a 2 horas (ver Fig. 2.1).

Entretanto, há uma grande variação na duração do ciclo celular, que vai desde algumas horas nas células com divisão rápida, tais como as da derme da pele ou da mucosa intestinal, até meses em outros tipos de células. De fato, alguns tipos de células, tais como os neurônios e as hemácias, não se dividem, pois são totalmente diferenciadas. Ao contrário, elas ficam permanentemente paradas durante G_1 em uma fase conhecida como G_0. Outras células, tais como as células hepáticas, podem entrar em G_0, mas, após um dano ao órgão, eventualmente voltam a G_1 e continuam o ciclo celular.

Mitose

Durante a fase mitótica do ciclo celular, constitui-se um elaborado aparelho para garantir que cada uma das duas células filhas receba um conjunto completo de informação genética. Este resultado é obtido por um mecanismo que distribui uma cromátide de cada cromossomo para cada célula filha e é ilustrado esquematicamente na Fig. 2.2. O processo de distribuição de uma cópia de cada cromossomo para cada célula filha é chamado de **segregação cromossômica**. A importância deste processo para o crescimento celular normal é ilustrada pela observação de que muitos tumores são invariavelmente caracterizados por um estado de desequilíbrio genético que resulta de erros mitóticos na distribuição de cromossomos para as células filhas.

O processo de mitose é contínuo, mas são distintos cinco estágios: prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase.

Prófase. Este estágio inicia a mitose e é marcado por uma condensação gradual dos cromossomos, eventual desaparecimento do nucléolo e começo da formação do **fuso mitótico**. Um par de centros organizadores de microtúbulos, também chamado de **centrossomos,** formam focos dos quais se irradiam os microtúbulos. Os centrossomos movem-se gradualmente para tomar posições nos pólos da célula.

Pró-metáfase. A célula entra na pró-metáfase quando a membrana nuclear se desfaz, permitindo que os cromossomos se dispersem na célula e se liguem, via seus cinetócoros, aos microtúbulos do fuso mitótico. Os cromossomos começam a se mover para um ponto mediano entre os pólos do fuso, um processo chamado de **congregação.** Os cromossomos continuam a se condensar durante este estágio.

Metáfase. Na metáfase, os cromossomos atingem a máxima condensação. Eles se tornam dispostos na placa equatorial da célula, balanceados pelas forças iguais exercidas no cinetócoro de cada cromossomo pelos microtúbulos que emanam dos dois pólos do fuso. Os cromossomos de uma célula humana em divisão são analisados mais facilmente na metáfase ou no estágio de pró-metáfase da mitose (ver discussão mais adiante e no Cap. 9).

Anáfase. A anáfase começa abruptamente quando os cromossomos se separam no centrômero. As cromátides irmãs de cada cromossomo agora se tornam **cromossomos filhos** independentes, que se movem para os pólos opostos da célula (ver Fig. 2.2).

Telófase. Na telófase, os cromossomos começam a se descondensar de seu estado altamente contraído, começa a ser reconstituída a membrana nuclear ao redor de cada um dos dois núcleos filhos e cada núcleo gradualmente reassume seu aspecto interfásico.

Para completar o processo da divisão celular, o citoplasma é clivado por um processo conhecido como **citocinese,** o qual

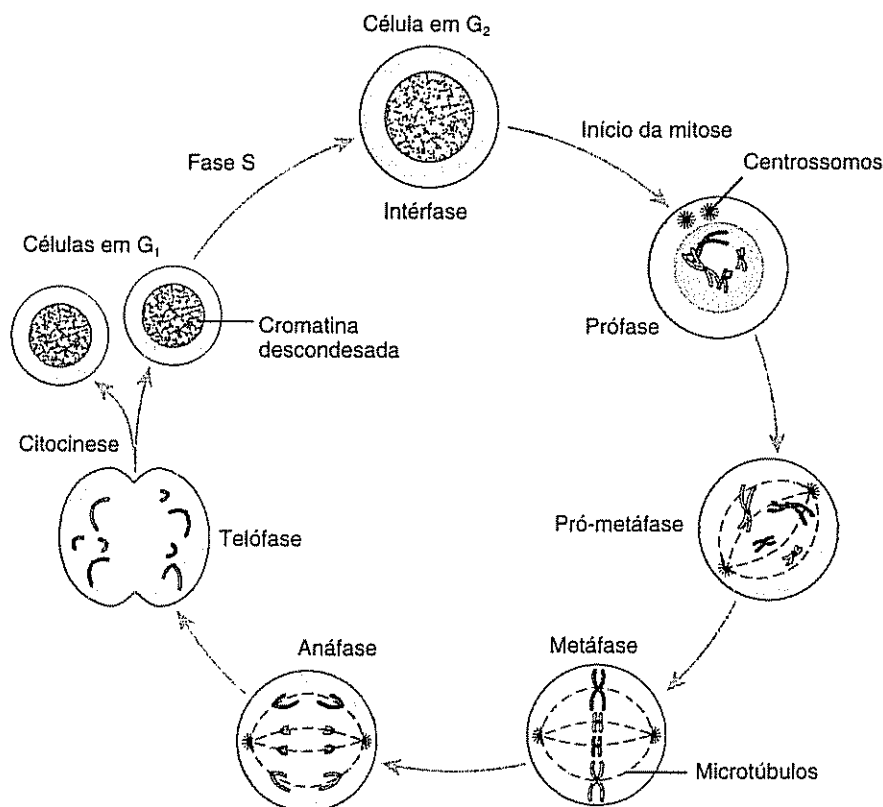



Fig. 2.2 Mitose. Representação diagramática, mostrando apenas dois pares de cromossomos. Para maiores detalhes, ver o texto.

começa à medida que os cromossomos se aproximam dos pólos do fuso. Formam-se duas células filhas completas, cada uma com um núcleo contendo toda a informação genética da célula original.

Há uma diferença importante entre uma célula que entra em mitose e uma que acabou de completar o processo. Cada cromossomo da célula original em G_2 tem um par de cromátides, mas os cromossomos da células filhas consistem em apenas uma cópia do material genético. Esta cópia só será duplicada quando a célula filha atingir a fase S do próximo ciclo celular (ver Fig. 2.1). Todo o processo de mitose garante uma duplicação ordenada e uma distribuição do genoma por sucessivas divisões celulares.

O Cariótipo Humano

Os cromossomos condensados de uma célula humana em divisão são prontamente analisados na metáfase ou na pró-metáfase. Nestes estágios, os cromossomos são visíveis ao microscópio como uma **dispersão cromossômica** e cada cromossomo pode ser visto constituído de suas cromátides irmãs, unidas pelo centrômero.

A maioria dos cromossomos pode ser diferenciada não só por seu tamanho, mas também pela localização do centrômero. O centrômero é aparente como uma **constrição primária**, um marco citogenético reconhecível, dividindo o cromossomo em dois **braços**, um braço curto, designado por **p** (de *petit*), e um braço longo, designado por **q**. Os métodos de coloração originalmente disponíveis para análise citogenética humana, entretanto, não permitiam a identificação individual dos 24 tipos de cromossomos (22 autossomos, X e Y). Os cromossomos podiam ser classificados apenas em sete grupos, designados pelas letras A a G, com base em seu tamanho geral e posição do centrômero. Estas designações não são mais de uso geral, mas são vistas na literatura. Com as técnicas de uso comum hoje em dia, todos os cromossomos podem ser individualmente identificados.

A Fig. 2.3 mostra uma célula em pró-metáfase na qual os cromossomos foram corados pelo método de bandeamento Giemsa (**bandeamento G**), a técnica mais amplamente usada nos laboratórios de citogenética. Primeiro os cromossomos são tratados com tripsina, para digerir as proteínas cromossômicas, e então com o corante Giemsa. Cada par de cromossomos cora-se de modo característico de bandas claras e escuras (bandas G). Usando este método e outras técnicas de bandeamento, todos os cromossomos podem ser individualmente diferenciados. Mais ainda: a natureza de qualquer anomalia estrutural ou numérica pode ser prontamente determinada, como veremos em maiores detalhes nos Caps. 9 e 10.

Embora os especialistas com freqüência possam analisar os cromossomos metafásicos diretamente ao microscópio, um procedimento comum é recortar os cromossomos de uma fotomicrografia e arrumá-los aos pares em uma classificação padrão, como mostra a Fig. 2.4. O resultado final é chamado de um **cariótipo**. A palavra *cariótipo* também é usada para designar o conjunto cromossômico padrão de um indivíduo ("um cariótipo masculino normal") ou de uma espécie ("o cariótipo humano") e, como verbo, para se referir ao processo de preparação de tal figura padrão ("cariotipar").

Ao contrário dos cromossomos vistos em preparações coradas ao microscópio ou em fotografias, os cromossomos de células vivas são estruturas fluidas e dinâmicas. Durante a mitose, por exemplo, a cromatina de cada cromossomo interfásico condensa-se muito (Fig. 2.5). Na prófase, quando os cromossomos tornam-se visíveis ao microscópio óptico, o cromossomo 1 ficou condensado a um tamanho total de cerca de 50 μm. Quando condensado de forma máxima na metáfase, o DNA dos cromossomos tem cerca de 1/10.000 de seu estado totalmente distendido. Quando os cromossomos são preparados para revelar bandas (ver Figs. 2.3 e 2.4), até 1.000 bandas ou mais podem ser reconhecidas em preparações coradas de todos os cromossomos, e cada banda citogenética contém, portanto, até 50 genes ou mais. Após a metáfase, à medida que as células completam a mitose, os cromossomos descondensam-se e voltam ao seu estado relaxado como cromatina no núcleo interfásico, prontos para começar o ciclo outra vez (ver Fig. 2.5).

Fig. 2.3 Uma dispersão cromossômica preparada a partir de uma cultura de linfócitos que foi corada com bandeamento Giemsa (bandeamento G). O núcleo de cor escura adjacente aos cromossomos é de uma célula diferente em intérfase, quando o material cromossômico está difuso pelo núcleo. (Fotomicrografia por cortesia de Stuart Schwartz, University Hospitals of Cleveland.)

Meiose

A meiose é o tipo de divisão celular pelo qual as células diplóides da linhagem germinativa originam gametas haplóides. A meiose consiste em uma rodada de síntese de DNA seguida de duas rodadas de segregação cromossômica e divisão celular (Fig. 2.6). As células na linhagem germinativa que sofrem meiose, espermatócitos e ovócitos primários, são derivadas do zigoto por uma longa série de mitoses antes do início da meiose.

Os gametas masculinos e femininos têm histórias diferentes, mas a seqüência de eventos é a mesma, embora suas épocas sejam bem diferentes. As duas divisões meióticas sucessivas são chamadas de meiose I e meiose II. A meiose I também é conhecida como **divisão reducional**, pois é a divisão na qual o número de cromossomos é reduzido de diplóide para haplóide pelo pareamento de homólogos na prófase e pela sua segregação para células diferentes na anáfase da meiose I. Os cromossomos X e Y não são homólogos no sentido estrito, mas têm segmentos

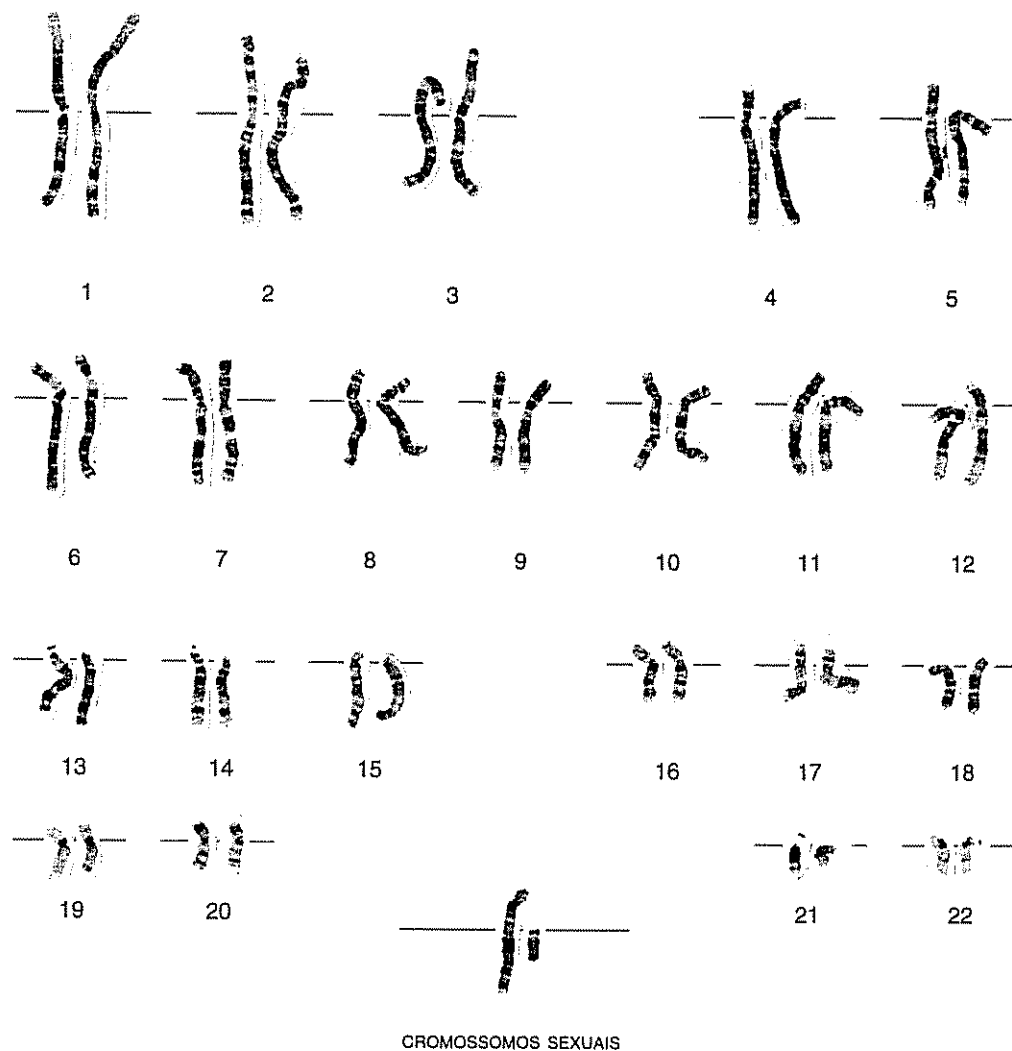



Fig. 2.4 Um cariótipo humano masculino com bandeamento Giemsa (bandeamento G) Os cromossomos estão no estágio de pró-metáfase da mitose e estão dispostos em uma classificação padrão, numerados de 1 a 22 em ordem de tamanho, com os cromossomos X e Y mostrados separadamente (Fotomicrografia por cortesia de Stuart Schwartz, University Hospitals of Cleveland.)

homólogos nas pontas de seus braços curtos e longos e ficam pareados em ambas as regiões.

A meiose I também é notável porque é o estágio no qual ocorre a **recombinação** genética (também chamada de **crossing over meiótico**). Neste processo, os segmentos homólogos de DNA são trocados entre as cromátides não-irmãs de um par de cromossomos homólogos, garantindo assim que nenhum dos gametas produzidos pela meiose seja idêntico a outro. O conceito de recombinação é fundamental para o processo de mapeamento dos genes responsáveis por distúrbios herdados, como discutiremos com mais detalhes no Cap. 8. Como a recombinação envolve o entrelace físico dos dois homólogos até um ponto apropriado durante a meiose I, ela também é crítica para garantir a segregação cromossômica apropriada durante a meiose. A falha em se recombinar de forma apropriada pode levar a uma segregação errada de cromossomos na meiose I e é uma causa freqüente de anomalias cromossômicas, como a síndrome de Down (ver Cap. 9)

A meiose II segue-se à meiose I sem uma etapa intercalar de replicação do DNA. Como na mitose comum, as cromátides separam-se e uma cromátide de cada cromossomo passa para cada célula filha. Alguns dos estágios distintos na meiose, bem como o processo de crossing over, são mostrados na Fig. 2.7.

A Primeira Divisão Meiótica (Meiose I)

Prófase I

A prófase da meiose I é um processo complicado que difere da prófase mitótica de vários modos, com conseqüências genéticas importantes. Vários estágios são definidos. Ao longo de todos os estágios, os cromossomos condensam-se continuamente, ficando mais curtos e mais grossos.

Leptóteno. Os cromossomos, que já se replicaram durante a fase S anterior, tornam-se visíveis como filamentos finos que estão começando a se condensar. Neste estágio inicial, as duas cromátides irmãs de cada cromossomo estão em tal proximidade que não podem ser distintas.

Zigóteno. Neste estágio, os cromossomos homólogos começam a se parear ao longo de todo o seu comprimento. O processo de pareamento, ou **sinapse**, normalmente é muito preciso, colocando seqüências correspondentes de DNA em alinhamento ao longo do tamanho de todo o cromossomo.

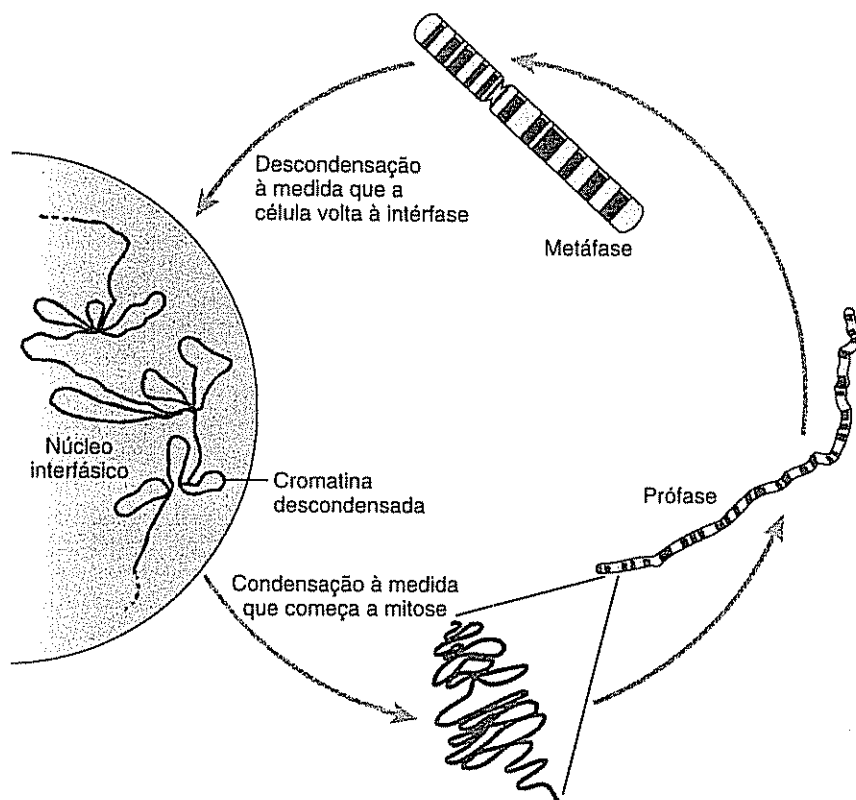



Fig. 2.5 Ciclo de condensação e descondensação à medida que um cromossomo progride no ciclo celular

Embora a base molecular da sinapse não seja totalmente compreendida, a microscopia eletrônica revela que os cromossomos são mantidos juntos por um **complexo sinaptinêmico**, uma estrutura contendo proteínas (Fig. 2.8). O complexo sinaptinêmico é essencial ao processo de recombinação.

Fig. 2.6 Uma representação simplificada das etapas essenciais na meiose. consistindo em uma rodada de replicação do DNA. seguida de duas rodadas de segregação cromossômica. meiose I e meiose II

Paquíteno. Durante este estágio, os cromossomos tornam-se mais helicoidizados. A sinapse está completa e cada par de homólogos apresenta-se como um **bivalente** (às vezes chamado de **tétrade** porque contém quatro cromátides). O paquíteno é o estágio no qual ocorre o crossing over (ver Fig. 2.7).

Diplóteno. Após a recombinação, o complexo sinaptinêmico desaparece, e os dois componentes de cada bivalente agora começam a se separar uns dos outros. Embora os cromossomos homólogos separem-se, cada um de seus centrômeros permanece intato, de modo que cada conjunto de cromátides irmãs inicialmente permanece unidas. Eventualmente os dois homólogos de cada bivalente são mantidos juntos apenas em pontos chamados **quiasmas** (cruzamentos), que são tidos como marcando os locais de crossings. O número médio de quiasmas vistos em espermatócitos humanos é de cerca de 50, isto é, vários por bivalente.

Diacinese. Neste estágio, os cromossomos atingem a condensação máxima.

METÁFASE I

A metáfase I começa, como na mitose, quando a membrana nuclear desaparece. Forma-se um fuso, e os cromossomos pareados alinham-se na placa equatorial com seus centrômeros orientados para pólos diferentes.

ANÁFASE I

Os dois membros de cada bivalente separam-se e seus respectivos centrômeros com as cromátides irmãs ligadas são levados para pólos opostos da célula, em um processo chamado

de **disjunção**. Assim, o número de cromossomos é reduzido à metade, e cada produto celular da meiose I tem o número haplóide de cromossomos. Os bivalentes diferentes se segregam independentemente um do outro e, como resultado, os conjuntos originais de cromossomos paterno e materno são distribuídos em combinações aleatórias. O número possível de combinações dos 23 pares de cromossomos que podem estar presentes nos gametas é 2^{23} (mais de 8 milhões). De fato, a variação no material genético que é transmitido do genitor para a prole é muito maior que isto por causa do processo de crossing over. Como resultado deste processo, cada cromátide contém tipicamente segmentos derivados de cada membro do par cromossômico parental. Por exemplo, neste estágio, um cromossomo 1 típico é composto de três a cinco segmentos, alternadamente de origem paterna e materna. (Ver uma maior discussão no Cap. 8.)

Muitos erros podem ocorrer na divisão celular. A anáfase da meiose I é a etapa mais propensa a erro, o que resulta em ambos os homólogos de um par cromossômico indo para o mesmo pólo em vez de para pólos opostos. Este processo patogênico é chamado de **não-disjunção**. Algumas das conseqüências das irregularidades meióticas serão discutidas nos Caps. 9 e 10.

TELÓFASE I

Na telófase, os dois conjuntos haplóides de cromossomos normalmente se agrupam em pólos opostos da célula.

Citocinese

Após a telófase I, a célula divide-se em duas células filhas haplóides e entra na intérfase meiótica. Na espermatogênese, o citoplasma é dividido mais ou menos igualmente entre as duas células filhas (Fig. 2.9), mas na ovocitogênese um produto (o ovócito secundário) recebe quase todo o citoplasma, e o produto recíproco torna-se o primeiro glóbulo polar (Fig. 2.10). Em contraste à mitose, a intérfase é curta, e a meiose II começa. O ponto notável que distingue a intérfase meiótica e mitótica é que não há fase S (sem síntese de DNA) entre a primeira e a segunda divisões meióticas.

A Segunda Divisão Meiótica (Meiose II)

A segunda divisão meiótica é similar a uma mitose comum, exceto pelo fato de que o número de cromossomos da célula que entra em meiose II é haplóide. O resultado final é de quatro células haplóides, cada uma contendo 23 cromossomos (ver Fig. 2.7). Como mencionado antes, por causa do crossing over na

Fig. 2.7 Representação diagramática da meiose e suas conseqüências. Um único par de cromossomos e um só crossing são mostrados, levando à formação de quatro gametas distintos. Os cromossomos replicam-se durante a intérfase e começam a se condensar à medida que a célula entra na prófase da meiose I. Na meiose I, os cromossomos ficam pareados e recombinam-se. Os quiasmas são visíveis à medida que os homólogos alinham-se na metáfase I, com os centrômeros orientados para pólos opostos. Na anáfase I, a troca de DNA entre os homólogos é aparente à medida que os cromossomos são levados para pólos opostos. Após o término da meiose I e da citocinese, a meiose II continua com uma divisão tipo mitose. Os cinetócoros irmãos separam-se e movem-se para os pólos opostos na anáfase II, gerando quatro produtos haplóides.

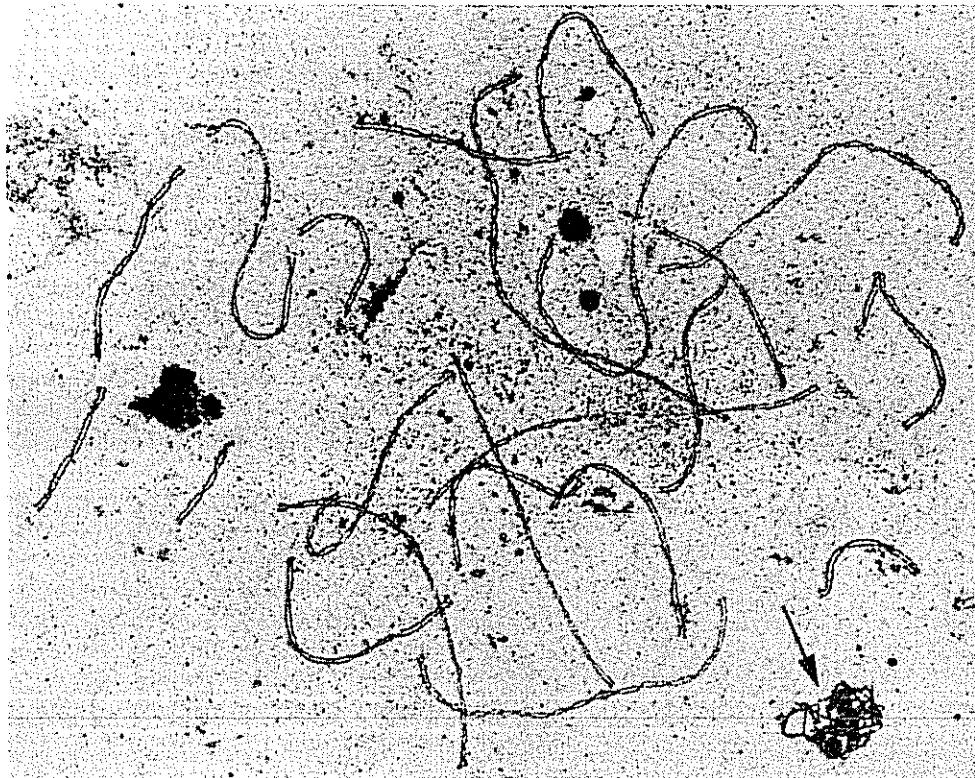



Fig. 2.8 Micrografia eletrônica de um espermatócito primário humano em meiose, mostrando os 22 complexos sinaptinêmicos autossômicos e o par XY (*seta*). O DNA de cada bivalente não é visível, mas está distendido lateralmente em cada lado dos complexos sinaptinêmicos (Fotomicrografia por cortesia de A. C. Chandley, Western General Hospital, Edinburgh.)

meiose I, os cromossomos dos gametas resultantes não são idênticos. A segregação de diferentes alelos paternos e maternos de cada gene ocorre durante a primeira ou a segunda divisão meiótica (ver boxe), dependendo de se eles estiveram envolvidos em um evento de crossing na meiose I.

GAMETOGÊNESE HUMANA E FERTILIZAÇÃO

As células germinativas humanas primordiais são reconhecíveis na quarta semana do desenvolvimento do embrião, na endoderme do saco vitelínico. A partir daí, elas migram durante a sexta semana para as cristas genitais e associam-se às células somáticas para formar as gônadas primitivas, que logo se diferenciam em testículos e ovários, dependendo da constituição dos cromossomos sexuais (XY ou XX) das células, como veremos em maiores detalhes no Cap. 10. Tanto a espermatogênese quanto a ovocitogênese necessitam de meiose, mas têm diferenças importantes em detalhes e época que podem ter conseqüências clínicas e genéticas para a prole. A meiose feminina é iniciada uma vez, cedo durante a vida fetal, em um número limitado de células. Em contraste, a meiose masculina é iniciada continuamente em muitas células de uma população de células em divisão, ao longo da vida adulta de um homem.

É difícil estudar a meiose humana diretamente. Na mulher, os sucessivos estágios da meiose ocorrem no ovário fetal, no ovócito próximo à época da ovulação e após a fertilização. Embora os estágios de pós-fertilização possam ser estudados *in vitro*, o acesso aos estágios iniciais é limitado. O material testicular para o estudo da meiose masculina é menos difícil de se obter, pois a biópsia testicular é incluída na avaliação de muitos homens que procuram clínicas de infertilidade. Ainda temos muito o que aprender sobre a citogenética, a bioquímica e os mecanismos moleculares envolvidos na meiose normal, bem como sobre as causas e conseqüências das irregularidades meióticas.

Conseqüências Genéticas da Meiose

1. **Redução do número de cromossomos** de diplóide para haplóide, a etapa essencial na formação de gametas.
2. **Segregação de alelos,** tanto na meiose I quanto na meiose II, de acordo com a primeira lei de Mendel.
3. Embaralhamento do material genético por **distribuição independende dos homólogos,** de acordo com a segunda lei de Mendel.
4. Embaralhamento adicional de material genético por **crossing over,** que é tido como tendo evoluído como um mecanismo para aumentar substancialmente a variação genética, mas que, além disso, é crucial para garantir a distribuição cromossômica normal.

Espermatogênese

Os estágios da espermatogênese são mostrados na Fig. 2.9. Os **espermatozóides** são formados nos túbulos seminíferos dos testículos após ter sido atingida a maturidade sexual. Os túbulos

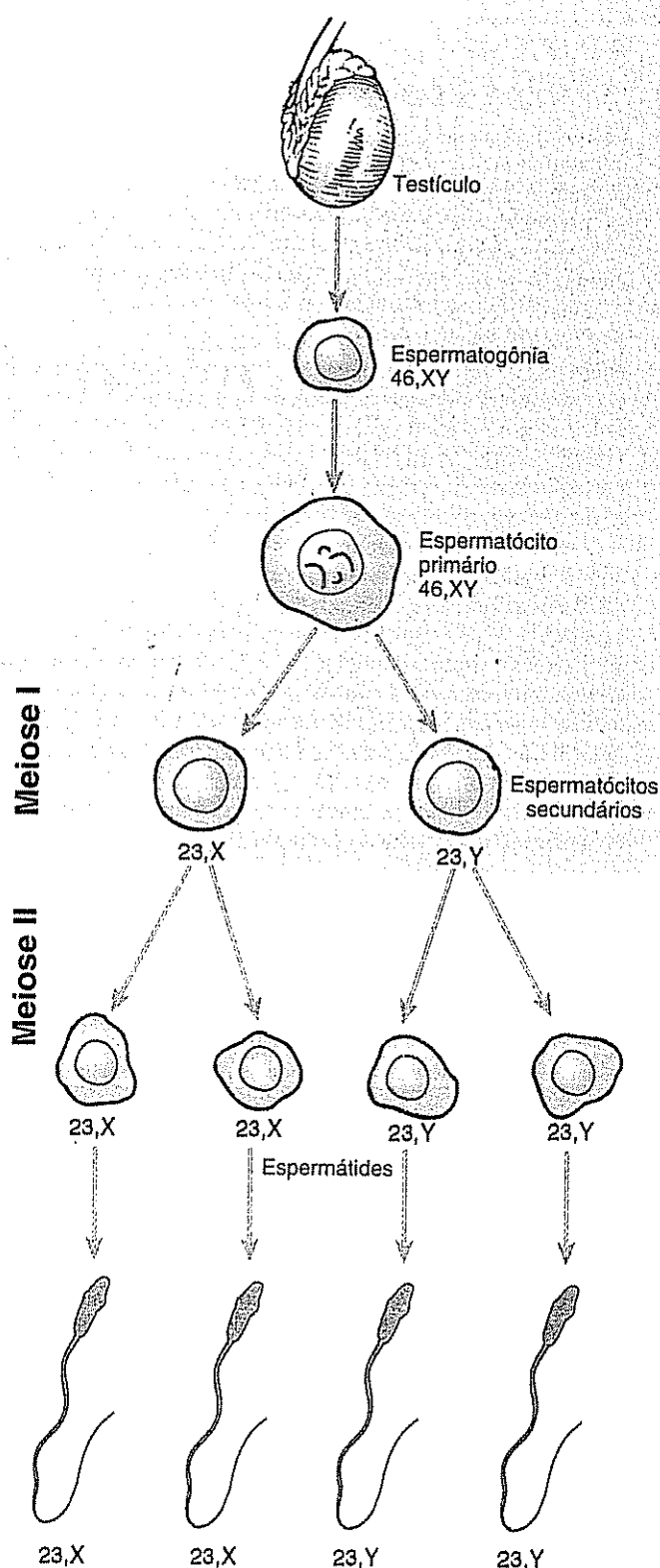



Fig. 2.9 Diagrama para ilustrar a espermatogênese em relação às duas divisões meióticas. A seqüência de eventos começa na puberdade e leva cerca de 64 dias para se completar. São mostrados o número de cromossomos (46 ou 23) e a constituição dos cromossomos sexuais (X ou Y) de cada célula. (Modificada de Moore K. L e Persaud T. V. N. [1998] The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 6.ª ed. W. B. Saunders, Philadelphia.)

são revestidos de **espermatogônias**, que estão em estágios diferentes de diferenciação. Estas células desenvolveram-se de células germinativas primordiais por uma longa série de mitoses. O último tipo de célula na seqüência de desenvolvimento é o **espermatócito primário**, que sofre meiose I para formar dois **espermatócitos secundários** haplóides. Os espermatócitos secundários rapidamente entram na meiose II, cada um formando duas **espermátides**, que se diferenciam sem outras divisões em **espermatozóides**. Nos seres humanos, todo o processo leva cerca de 64 dias. O enorme número de espermatozóides produzidos, tipicamente 200 milhões por ejaculação e uma estimativa de 10^{12} durante a vida, requer várias centenas de mitoses sucessivas.

Ovocitogênese

Em contraste à espermatogênese, que é contínua durante a vida adulta, a ovocitogênese é confinada ao desenvolvimento pré-natal. O processo é mostrado na Fig. 2.10. Os ovócitos desenvolvem-se das **ovogônias**, células no córtex ovariano que descendem das células germinativas primordiais por uma série de cerca de 30 mitoses. Cada ovogônia é a célula central de um folículo em desenvolvimento. Por volta do terceiro mês do desenvolvimento pré-natal, as ovogônias do embrião começaram a se desenvolver em **ovócitos primários**, a maioria dos quais já entrou em prófase I da meiose. O processo de ovocitogênese não é sincronizado, coexistindo tanto estágios iniciais quanto avançados no ovário fetal. Existem cerca de 2,5 milhões de ovócitos na época do nascimento, mas a maioria se degenera e apenas cerca de 400 eventualmente amadurecem. Na época do nascimento todos os ovócitos primários atingiram a prófase I, e aqueles que não se degeneram permanecem neste estágio por décadas.

Após uma mulher ter atingido a maturidade sexual, cada folículo individual amadurece e ocorre a ovulação. Cada ovócito completa rapidamente a meiose I, dividindo-se de tal modo que uma célula torna-se o ovócito secundário, contendo a maioria do citoplasma com suas organelas, e a outra se torna o primeiro glóbulo polar (ver Fig. 2.10). A meiose II começa imediatamente e continua para o estágio de metáfase durante a ovulação, mas só se completa se ocorrer a fertilização.

Fertilização

A fertilização do ovócito em geral ocorre na trompa falopiana cerca de um dia após a ovulação. Embora um grande número de espermatozóides esteja presente, a penetração de um só deles no ovócito desencadeia uma série de eventos bioquímicos que impedem a entrada de outro espermatozóide.

A fertilização é seguida do término da meiose II, com a formação do segundo glóbulo polar (ver Fig. 2.10). Os cromossomos do ovócito fertilizado e do espermatozóide tornam-se **prónúcleos**, cada um circundado por uma membrana nuclear. Os cromossomos do **zigoto** diplóide replicam-se logo após a fertilização, e o zigoto divide-se por mitose para formar duas células filhas diplóides. Esta mitose é a primeira de uma série de divisões de clivagem que iniciam o processo de desenvolvimento embrionário (ver Cap. 17).

Embora o desenvolvimento comece com a formação do zigoto (concepção), em medicina clínica, o estágio e a duração da gestação em geral são contados como a "idade menstrual", indo

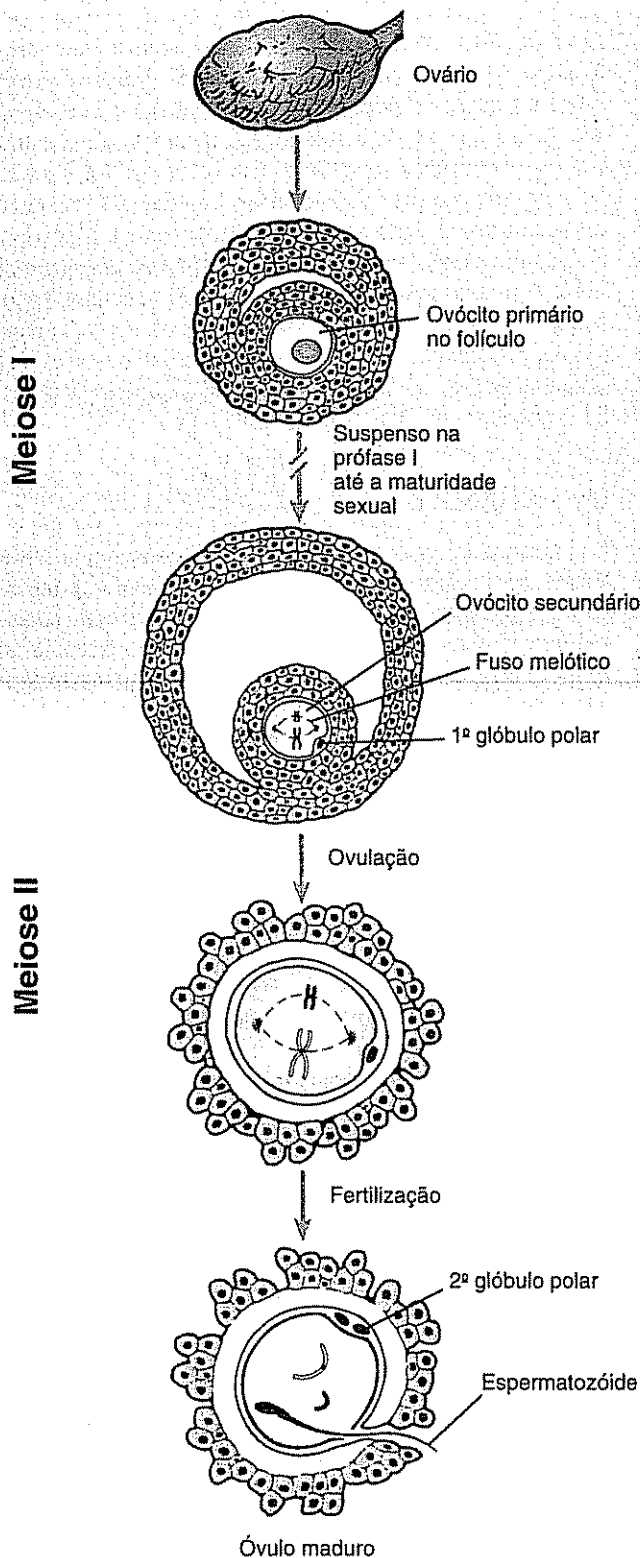



Fig. 2.10 Diagrama para ilustrar a ovocitogênese humana e a fertilização em relação às duas divisões meióticas. Os ovócitos primários são formados no período pré-natal e ficam suspensos na prófase da meiose I por décadas, até o início da puberdade. Um ovócito completa a meiose I à medida que seus folículos amadurecem, resultando em um ovócito secundário e o primeiro glóbulo polar. Após a ovulação, cada ovócito continua até a metáfase da meiose II. A meiose II só se completa se ocorrer a fertilização, resultando em um óvulo maduro e o segundo glóbulo polar.

desde o começo da última menstruação da mãe, cerca de 14 dias antes da concepção.

RELEVÂNCIA MÉDICA DA MITOSE E DA MEIOSE

O significado biológico da mitose e da meiose está em garantir a constância do número de cromossomos de uma célula para sua prole e de uma geração para a seguinte. A relevância médica destes processos está em erros de um ou outro mecanismo de divisão celular, levando à formação de uma pessoa ou uma linhagem celular com um número anormal de cromossomos.

Como veremos em detalhes no Cap. 9, a não-disjunção meiótica, em particular na ovocitogênese, é o mecanismo mutacional mais comum em nossa espécie, responsável por fetos cromossomicamente anormais em pelo menos uma boa porcentagem de todas as gestações reconhecidas. Entre as gestações que sobrevivem a termo, as anomalias cromossômicas são uma causa importante de defeitos de desenvolvimento, falta de desenvolvimento no período neonatal e retardo mental.

A não-disjunção mitótica também contribui para a doença genética. A não-disjunção logo após a fertilização, seja no embrião em desenvolvimento seja nos tecidos extra-embrionários, como a placenta, leva a um mosaicismo cromossômico que pode estar subjacente a algumas condições médicas, tais como uma proporção de pacientes com síndrome de Down. A segregação anormal de cromossomos em tecidos com divisão rápida, tais como nas células do cólon, com freqüência é uma etapa no desenvolvimento de tumores cromossomicamente anormais e, portanto, a avaliação do balanço cromossômico é um teste diagnóstico e prognóstico importante em muitos cânceres.

Referências Gerais

Handel MA (ed) (1998) Meiosis and Gametogenesis. Academic Press, San Diego.

Moore KL, Persaud TVN (1998) The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 6th ed. WB Saunders, Philadelphia.

Murray A, Hunt T (1993) The Cell Cycle: An Introduction. Oxford University Press, Oxford, England.

Therman E, Susman M (1993) Human Chromosomes: Structure, Behavior, Effects, 3rd ed. Springer-Verlag, New York.

Problemas

1. Em um determinado locus, uma pessoa tem dois alelos A e a.
   a) Quais os genótipos dos gametas desta pessoa?
   b) Quando A e a se segregam (i) se não houver crossing entre o locus e o centrômero do cromossomo? (ii) se houver um só crossing entre o locus e o centrômero?
2. Qual a principal causa das anomalias cromossômicas numéricas nos seres humanos?
3. Não considerando o crossing, que aumenta a quantidade de variabilidade genética, avalie a probabilidade de que todos os seus cromossomos tenham vindo da mãe de seu pai e da mãe de sua mãe. Você seria homem ou mulher?
4. Um cromossomo que está entrando em meiose é composto de duas cromátides, cada uma das quais tem uma única molécula de DNA.
   a) Em sua espécie, ao final da meiose I, quantos cromossomos existem por célula? Quantas cromátides?
   b) Ao final da meiose II, quantos cromossomos existem por célula? Quantas cromátides?
   c) Quando o número diplóide de cromossomos é restaurado? Quando a estrutura de duas cromátides de um típico cromossomo metafásico é restaurada?

O Genoma Humano: Estrutura e Função dos Genes e Cromossomos

Nos últimos 20 anos, um grande progresso foi feito em nossa compreensão sobre a estrutura e a função dos genes e cromossomos no nível molecular. Mais recentemente, isto foi suplementado por uma compreensão aprofundada da organização do genoma humano no nível de sua seqüência de DNA. Estes avanços deveram-se em grande parte às aplicações da genética molecular e da genômica a muitas situações clínicas, fornecendo assim os instrumentos para um enfoque novo e diferente à genética médica. Neste capítulo apresentamos uma visão geral da organização do genoma humano e os aspectos da genética molecular que são necessários para uma compreensão do enfoque genético à medicina. Este capítulo não pretende fornecer uma ampla descrição da abrangência das novas informações sobre a estrutura e a regulação gênica. Para suplementar a informação discutida aqui, o Cap. 4 descreve muitos enfoques experimentais da genética molecular moderna que estão se tornando cruciais para a prática e a compreensão da genética humana e médica.

O aumento do conhecimento dos genes, bem como de sua organização no genoma, teve um enorme impacto na medicina e na nossa percepção da fisiologia humana. Como disse Paul Berg, ganhador do Prêmio Nobel, no início desta nova era:

> Assim como nosso atual conhecimento e nossa prática da medicina baseiam-se em um sofisticado conhecimento da anatomia humana, da fisiologia e da bioquímica, lidar com a doença no futuro demandará uma compreensão detalhada da anatomia molecular, fisiologia e bioquímica do genoma humano ... Precisaremos de um conhecimento mais detalhado sobre como os genes humanos são organizados e como eles funcionam e são regulados. Precisaremos também de médicos que conheçam a anatomia molecular e a fisiologia dos cromossomos e genes, como o cirurgião cardíaco conhece o funcionamento do coração.

ESTRUTURA DO DNA: UMA BREVE REVISÃO

O DNA é uma macromolécula polimérica de ácido nucleico composta de três tipos de unidades: um açúcar de cinco carbonos, a desoxirribose, uma base nitrogenada e um grupo fosfato (Fig. 3.1). As bases são de dois tipos, purinas e pirimidinas. No DNA, existem duas bases purinas, adenina (A) e guanina (G), e duas bases pirimidinas, timina (T) e citosina (C). Os nucleotídeos, cada um composto de uma base, um fosfato e um açúcar, polimerizam-se em longas cadeias polinucleotídicas por ligações fosfodiéster 5'-3' formadas entre unidades adjacentes de desoxirribose (Fig. 3.2). No genoma humano, estas cadeias polinucleotídicas (em sua forma de dupla hélice) têm centenas de milhões de nucleotídeos de tamanho longo, variando de cerca de 50 milhões de pares de bases (para o menor cromossomo, o 21) até 250 milhões de pares de bases (para o maior cromossomo, o 1).

A estrutura anatômica do DNA leva a informação química que permite a transmissão exata da informação genética de uma célula para suas células filhas e de uma geração para a seguinte. Ao mesmo tempo, a estrutura primária do DNA especifica as seqüências de aminoácidos das cadeias polipeptídicas das proteínas, como será descrito mais adiante neste capítulo. O DNA tem características especiais que lhe dão estas propriedades. O estado nativo do DNA, como esclarecido por James Watson e Francis Crick em 1953, é uma dupla hélice (Fig. 3.3). A estrutura helicoidal assemelha-se a uma escada em caracol com giro para a direita, na qual suas duas cadeias polinucleotídicas correm em sentidos opostos, mantidas juntas por pontes de hidrogênio entre os pares de bases: A em uma cadeia pareada com T da outra e G com C (ver Fig. 3.3). Conseqüentemente, o conhecimento da seqüência de nucleotídeos em um filamento automaticamente nos permite determinar a seqüência de bases do outro filamento. A estrutura em dupla hélice das moléculas de DNA permite que elas se repliquem precisamente pela separação dos dois filamentos, seguida pela síntese de dois novos filamentos complementares, de acordo com a seqüência dos filamentos-molde originais (Fig. 3.4). Similarmente, quando necessário, a complementariedade permite um reparo eficiente e correto das moléculas danificadas de DNA.

O DOGMA CENTRAL: DNA → RNA → PROTEÍNA

A informação genética está contida no DNA dos cromossomos dentro do núcleo celular, mas a síntese de proteínas, durante a qual a informação codificada no DNA é usada, ocorre no citoplasma. Esta compartimentalização reflete o fato de que o organismo humano é um **eucarionte**. Isto significa que as células humanas têm um núcleo genuíno que contém o DNA, o qual é separado do citoplasma por uma membrana nuclear. Em contraste, nos procariontes, como na bactéria intestinal *Escherichia coli*, o DNA não está encer-

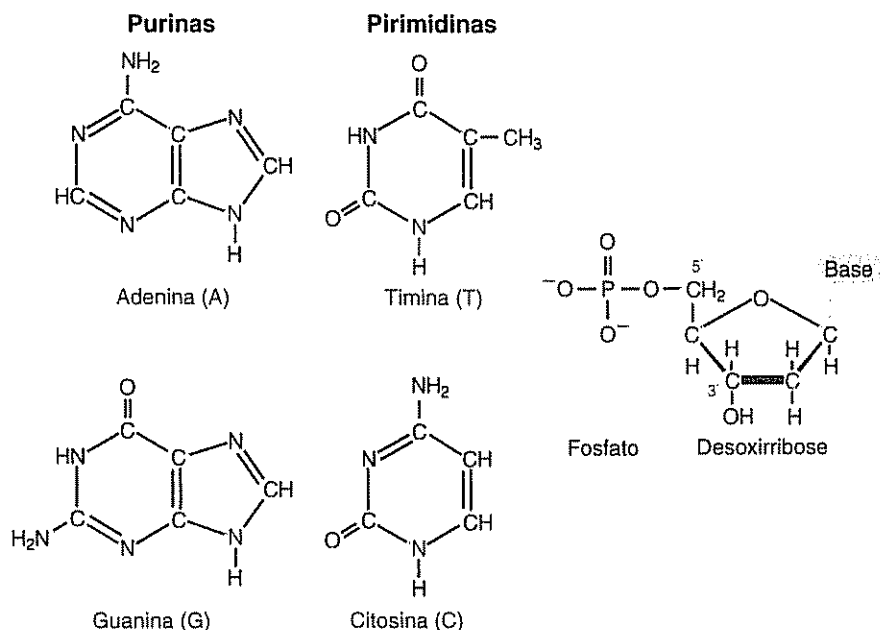



Fig. 3.1 As quatro bases do DNA e a estrutura geral de um nucleotídeo no DNA. Cada uma das quatro bases liga-se à desoxirribose (pelo nitrogênio mostrado em vermelho) e a um grupo fosfato para formar os nucleotídeos correspondentes.

rado dentro de um núcleo. Devido à compartimentalização das células eucarióticas, a transferência de informação do núcleo para o citoplasma é um processo muito complexo, que tem sido foco da atenção dos biólogos moleculares e celulares.

Fig. 3.2 Um trecho de uma cadeia polinucleotídica de DNA, mostrando as ligações fosfodiéster 3'-5' que unem nucleotídeos adjacentes.

A ligação molecular entre estes dois tipos relacionados de informação (o código de DNA dos genes e o código de aminoácidos das proteínas) é o **ácido ribonucleico (RNA)**. A estrutura química do RNA é similar à do DNA, exceto pelo fato de que cada nucleotídeo no RNA tem um açúcar ribose em vez de desoxirribose. Além disso, uracil (U) substitui timina como uma das pirimidinas do RNA (Fig. 3.5). Uma diferença adicional entre o RNA e o DNA é que na maioria dos organismos o RNA existe como uma molécula unifilamentar, enquanto o DNA existe como uma dupla hélice.

A correlação informacional entre DNA, RNA e proteína está interligada: o DNA dirige a síntese e a seqüência do RNA, o RNA dirige a síntese e a seqüência dos polipeptídeos e especifica as proteínas que estão envolvidas na síntese e no metabolismo do DNA e do RNA. Este fluxo de informação é chamado de "dogma central" da biologia molecular.

A informação genética é estocada no DNA por meio de um código (o **código genético**, discutido mais adiante), no qual a seqüência de bases adjacentes determina a seqüência de aminoácidos no polipeptídeo codificado. Primeiro, o RNA é sintetizado a partir de um molde de DNA por um processo conhecido como **transcrição**. O RNA, levando a informação codificada em uma forma chamada de **RNA mensageiro (mRNA)**, é então transportado do núcleo para o citoplasma, onde a seqüência de RNA é decodificada, ou traduzida, para determinar a seqüência de aminoácidos na proteína que está sendo sintetizada. O processo de **tradução** ocorre nos **ribossomos**, que são organelas citoplasmáticas com sítios de ligação para todas as moléculas que interagem, incluindo o mRNA, envolvidas na síntese de proteínas. Os ribossomos são feitos de muitas proteínas estruturais diferentes em associação com um tipo específico de RNA, conhecido como **RNA ribossômico (rRNA)**. A tradução envolve ainda um terceiro tipo de RNA, o **RNA transportador (tRNA)**, que fornece a ligação molecular entre a seqüência de bases do mRNA e a seqüência de bases da proteína.

Devido ao fluxo interdependente de informação representado pelo dogma central, podemos começar a discussão da genéti-

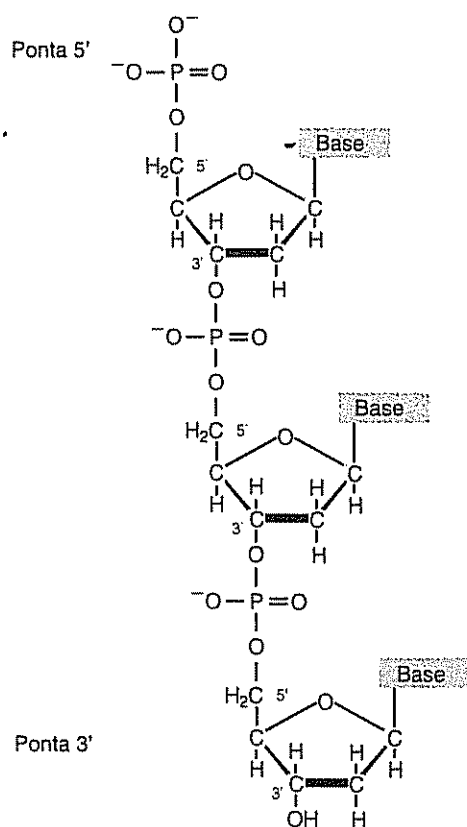
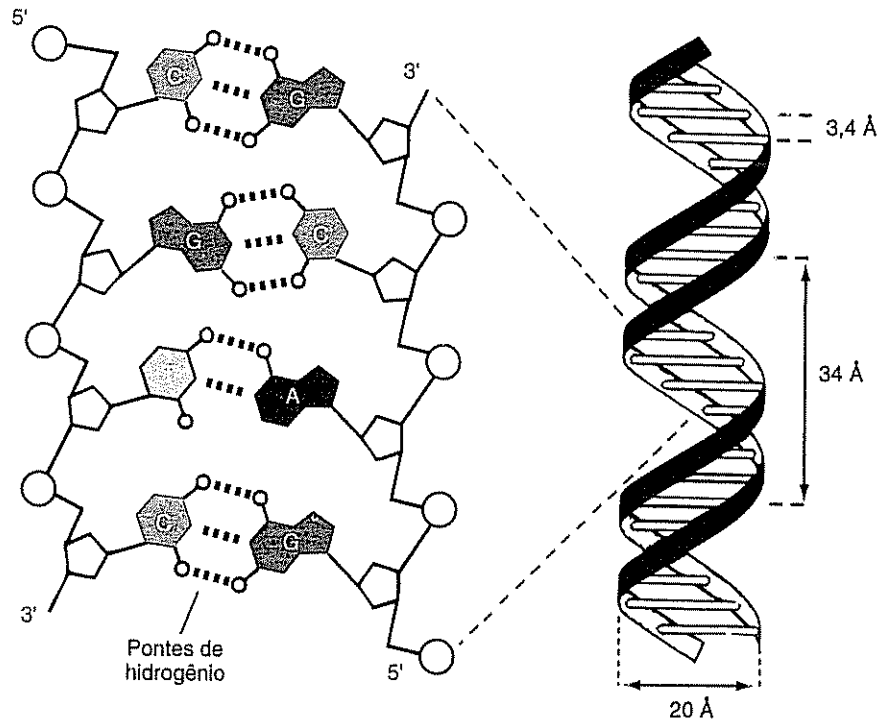



Fig. 3.3 A estrutura do DNA *Esquerda*: Uma representação bidimensional dos dois filamentos complementares de DNA, mostrando os pares de bases AT e GC. Notar que a orientação dos dois filamentos é invertida *Direita*: O modelo da dupla hélice de DNA, como proposto por Watson e Crick Os "degraus" horizontais representam as bases pareadas A hélice é dita dextrógira porque o filamento que vai do canto inferior esquerdo para o superior direito cruza o filamento oposto (Baseado em Watson J D, Crick F H C (1953) Molecular structure of nucleic acids — A structure for deoxyribose nucleic acid Nature 171:737-738)

ca molecular da expressão gênica em qualquer um dos três níveis informacionais: DNA, RNA ou proteína. Começaremos a examinar a estrutura dos genes como uma base para nossa discussão do código genético, transcrição e tradução.

Fig. 3.4 Replicação de uma dupla hélice de DNA que resulta em duas moléculas filhas idênticas, cada uma composta de um filamento parental (*preto*) e um recém-sintetizado (*vermelho*)

Estrutura e Organização do Gene

Em sua forma simples, um gene pode ser visualizado como um segmento de uma molécula de DNA contendo o código para a seqüência de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica e as seqüências reguladoras necessárias para a expressão. Esta descrição, entretanto, é inadequada para os genes do genoma humano (e, na verdade, para a maioria dos genomas eucarióticos), pois alguns genes existem como seqüências codificantes contínuas. A grande maioria dos genes é interrompida por uma ou mais regiões não-codificantes. Estas seqüências intercalares, chamadas **íntrons**, são inicialmente transcritas em RNA no núcleo, mas não estão presentes no mRNA final no citoplasma. Assim, a informação das seqüências intrônicas normalmente não é representada no produto proteico final. Os íntrons alternam-se com seqüências codificantes, ou **éxons**, que finalmente codificam a seqüência de aminoácidos da proteína (Fig. 3.6). Embora alguns genes do ge-

Fig. 3.5 A pirimidina uracil e a estrutura de um nucleotídeo no RNA. Notar que o açúcar ribose substitui o açúcar desoxirribose do DNA. Comparar com a Fig 3 1

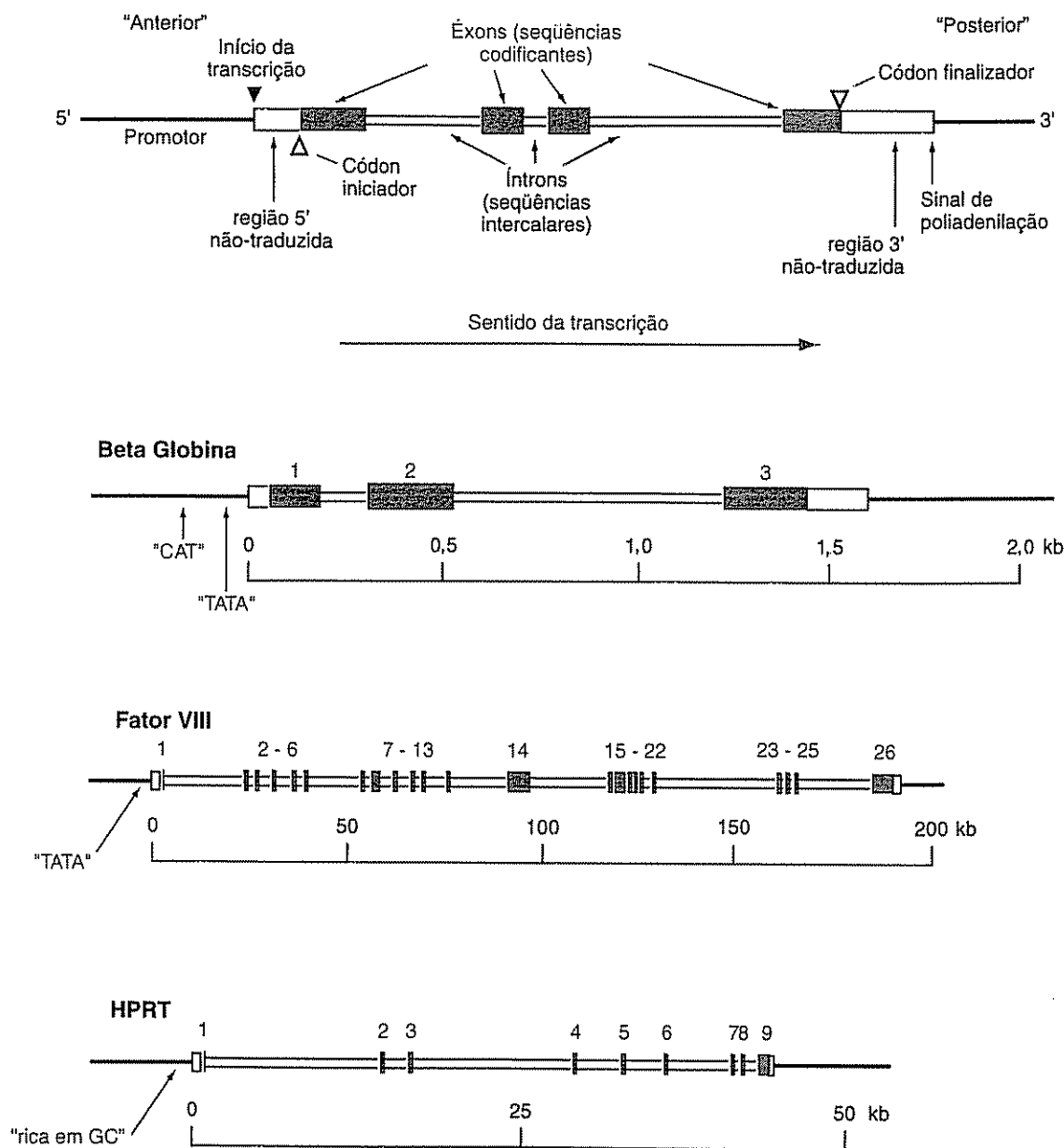



Fig. 3.6 Estrutura geral de um gene humano típico As características individuais estão marcadas na figura e são discutidas no texto Os exemplos de três genes humanos de importância médica são apresentados na parte inferior da figura Os éxons individuais são numerados Mutações diferentes no gene de β-globina causam uma variedade de hemoglobinopatias importantes As mutações no gene de fator VIII causam hemofilia A As mutações no gene de hipoxantina fosforibosiltransferase (*HPRT*) levam à síndrome de Lesch-Nyhan

noma humano não tenham íntrons, a maioria dos genes contém pelo menos um e em geral vários íntrons. Surpreendentemente, em muitos genes, o tamanho cumulativo dos íntrons é uma proporção muito maior do gene que o dos éxons. Embora alguns genes tenham apenas alguns quilobases (kb, em que 1 kb = 1.000 pares de bases) de tamanho, outros, como o gene de fator VIII mostrado na Fig. 3.6, têm centenas de quilobases. Existem alguns genes excepcionalmente grandes, incluindo o gene de distrofina ligado ao X (mutação que leva à distrofia muscular Duchenne), que ocupa mais de 2 milhões de pares de bases (2.000 kb), dos quais menos de 1% consiste em éxons codificantes.

Características Estruturais de um Gene Humano Típico

Uma representação esquemática de uma parte do DNA cromossômico contendo um gene típico é mostrada na Fig. 3.6, juntamente com a estrutura de vários genes de relevância médica. Juntos, ilustram a gama de características que caracteriza os genes humanos. Nos Caps. 1 e 2, definimos "gene" em termos gerais. Neste ponto, podemos dar uma definição molecular de um gene. Em circunstâncias típicas, definimos gene como *uma seqüência de DNA cromossômico que é necessária para a produção de um produto funcional*, seja um polipeptídeo ou uma molécula funcional de RNA. Como está claro na Fig. 3.6, um gene inclui não só as seqüências realmente codificantes, mas também as seqüências nucleotídicas adjacentes necessárias para a expressão apropriada do gene — isto é, para a produção de uma molécula normal de mRNA, na quantidade correta, no local correto e no momento correto durante o desenvolvimento ou durante o ciclo celular.

As seqüências adjacentes de nucleotídeos fornecem os sinais moleculares de "início" e "fim" para a síntese do mRNA transcrito do gene. Na ponta 5' do gene está uma região **promotora**,

que inclui seqüências responsáveis pelo início apropriado da transcrição. Dentro da região 5' estão vários elementos do DNA cuja seqüência é conservada entre muitos genes diferentes. Esta conservação, junto com os estudos funcionais da expressão gênica em muitos laboratórios, indica que estes elementos particulares de seqüência têm um papel importante na regulação. Existem vários tipos diferentes de promotor encontrados no genoma humano, com diferentes propriedades reguladoras que especificam os padrões de desenvolvimento, bem como os níveis de expressão de um determinado gene em tecidos diferentes. Os papéis dos elementos promotores individualmente conservados, identificados na Fig. 3.6, são discutidos em maiores detalhes na seção "Fundamentos da Expressão Gênica". Tanto os promotores quanto outros elementos reguladores (situados em 5' ou 3' de um gene ou em seus íntrons) podem ser sítios de mutação nas doenças genéticas que podem interferir com a expressão normal de um gene. Estes elementos reguladores, incluindo os **acentuadores**, os **silenciadores** e as **regiões controladoras de locus** (LCRs), serão discutidos mais amplamente mais adiante neste capítulo.

Na ponta 3' de um gene está uma região não-traduzida de importância que contém um sinal de adição de uma seqüência de unidades adenosina (a chamada cauda poliA) na ponta do mRNA final. Embora em geral seja aceito que tais seqüências reguladoras proximamente vizinhas são parte do que é chamado de "gene", as dimensões exatas de qualquer gene específico permanecerão um tanto incertas até que as funções potenciais das seqüências mais distantes sejam totalmente caracterizadas.

Famílias de Genes

Muitos genes pertencem a famílias de seqüências de DNA proximamente relacionadas, reconhecidas como famílias por causa da similaridade da seqüência de nucleotídeos dos próprios genes ou da seqüência de aminoácidos dos polipeptídeos codificados.

Uma família de genes pequena, mas medicamente importante, é composta de genes que codificam as cadeias de proteína encontradas nas hemoglobinas. Os grupamentos gênicos de α-globina e de β-globina, nos cromossomos 16 e 11, respectivamente, são mostrados na Fig. 3.7 e são tidos como tendo surgido por duplicação de um gene precursor primitivo há cerca de 500 milhões de anos. Estes dois grupamentos contêm genes que codificam cadeias de globina proximamente relacionadas expressas em estágios de desenvolvimento diferentes, do embrião até o adulto. Os genes individuais dentro de cada grupamento são mais similares em seqüência uns aos outros que a genes de outros grupamentos. Assim, cada grupo é tido como tendo evoluído de uma série de eventos seqüenciais de duplicação gênica nos últimos 100 milhões de anos. Os padrões éxon-íntron de genes de globina parecem ter sido bastante conservados durante a evolução. Cada um dos genes funcionais de globina mostrados na Fig. 3.7 tem dois íntrons em locais similares, embora as seqüências contidas dentro dos íntrons tenham acumulado muito mais mudanças de bases nucleotídicas com o tempo que as seqüências codificantes de cada gene. O controle da expressão dos vários genes de globina, no estado normal bem como nas muitas hemoglobinopatias herdadas, será considerado em maiores detalhes tanto mais adiante, neste capítulo, quanto no Cap. 11.

Vários genes de globina não produzem nenhum RNA ou produto proteico e, portanto, é improvável que tenham alguma função. As seqüências de DNA que se assemelham muito a genes conhecidos mas não são funcionais são chamadas de **pseudogenes**. Os pseudogenes estão dispersos no genoma e são tidos como subprodutos da evolução, representando genes que já foram funcionais mas que agora são vestigiais, tendo sido inativados por mutações em seqüências codificantes ou reguladoras. Em alguns casos, como nos genes de pseudo-α-globina e pseudo-β-globina, os pseudogenes supostamente surgiram por duplicação gênica, seguida da introdução de várias mutações nas cópias extras do gene que já foi funcional. Em outros casos, os pseudogenes foram formados por um processo, chamado de **retrotransposição**, que envolve a transcrição, a geração de uma cópia de DNA do mRNA e, finalmente, da integração de tais cópias de DNA ao genoma. Os pseudogenes criados por retrotransposição não têm íntrons e são chamados de **pseudogenes processados**. Eles não estão necessária ou usualmente no mesmo cromossomo (ou região cromossômica) que seu gene genitor.

A maior família de genes conhecida no genoma humano é a chamada **superfamília de imunoglobulina**, que inclui muitas centenas de genes envolvidos nos eventos de reconhecimento da superfície celular nos sistemas imune e nervoso, tais como os genes nos cromossomos 2, 14 e 22, que codificam as próprias cadeias pesada e leve de imunoglobulinas, os genes no cromossomo 6, que constituem o complexo principal de histocompatibilidade, os genes nos cromossomos 7 e 14, cujos produtos constituem o receptor de células T, e os genes que são expressos primariamente em tecidos neurais, tais como os genes para moléculas de adesão celular ou glicoproteínas associadas à mielina. A estrutura e a função de muitos destes genes serão examinadas em detalhes no Cap. 14.

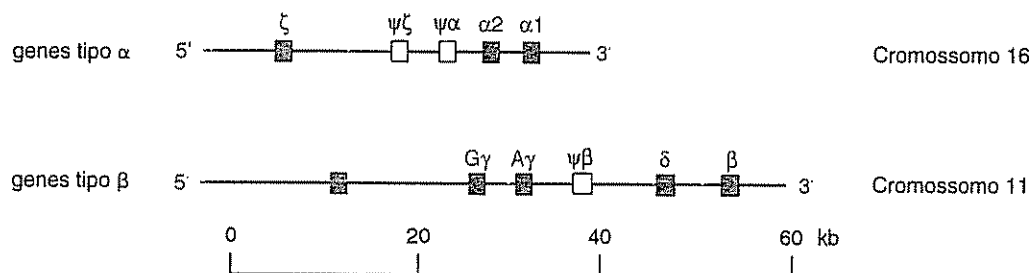



Fig. 3.7 Organização cromossômica de dois grupos de genes de globina humana. Os genes funcionais são indicados em vermelho. Os pseudogenes são indicados pelos boxes vazados. (Redesenhado de Nienhuis A. W., Maniatis T. [1987] Structure and expression of globin genes in erythroid cells. *In* Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A. W., Leder P., Majerus P. W. [eds.] The Molecular Basis of Blood Diseases. W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 28-65.)

FUNDAMENTOS DA EXPRESSÃO GÊNICA

O fluxo de informações do gene para o polipeptídeo envolve várias etapas (Fig. 3.8). O início da transcrição de um gene está sob a influência dos promotores e de outros elementos reguladores, bem como de proteínas específicas, conhecidas como **fatores de transcrição**, que interagem com seqüências específicas dentro destas regiões. A transcrição de um gene é iniciada no "ponto de início" transcricional no DNA cromossômico antecedente às seqüências codificantes e continua ao longo do cromossomo, indo desde várias centenas de pares de bases a mais de um milhão de pares de bases, ao longo tanto de íntrons quanto de éxons e além do final das seqüências codificantes. Após a modificação tanto das pontas 5' quanto das pontas 3' do transcrito primário de RNA, as partes correspondentes a íntrons são removidas e os segmentos correspondentes a éxons são reunidos. Após a recomposição do RNA, o mRNA resultante (agora colinear às partes codificantes do gene) é transportado do núcleo para o citoplasma, onde o mRNA é finalmente traduzido na seqüência de aminoácidos do polipeptídeo codificado. Cada uma das etapas desta via complexa está sujeita a erro, e as mutações que interferem nas etapas individuais foram implicadas em vários distúrbios genéticos (ver Caps. 5, 11 e 12).

Transcrição

A transcrição de genes codificantes de proteínas pela RNA polimerase II (uma das várias classes de RNA polimerases) é iniciada um pouco antes da primeira seqüência codificante no ponto inicial de transcrição, o ponto que corresponde à ponta 5' do produto final de RNA (ver Figs. 3.6 e 3.8). A síntese do transcrito primário de RNA ocorre no sentido 5' para 3', enquanto o filamento do gene transcrito é de fato lido no sentido 3' para 5' com relação à direção da estrutura desoxirribose fosfodiéster (ver Fig. 3.2). Como o RNA sintetizado corresponde tanto em polaridade quanto em seqüência de bases (substituindo T por U) ao filamento do DNA 5' para 3', este filamento de DNA não-transcrito às vezes é chamado de "codificante" ou "**com sentido**". O filamento de DNA 3' para 5' transcrito é então chamado de "não-codificante" ou "**anti-sentido**".* A trancrição continua incluindo íntrons e éxons do gene, além da posição no cromossomo que eventualmente corresponde à ponta 3' do mRNA final. Não sabemos se a transcrição termina em ponto final 3' predeterminado.

O transcrito primário de RNA é processado pela adição de uma estrutura química "*cap*" na ponta 5' do RNA e uma clivagem na ponta 3' em um ponto específico ao final da informação codificante. Esta clivagem é seguida pela adição de uma cauda poliA na ponta 3' do RNA. A cauda poliA parece aumentar a estabilidade do RNA poliadenilado resultante. O ponto de poliadenilação é especificado em parte pela seqüência AAUAAA

*N.T.: Esta inversão é uma causa constante de confusão por parte dos alunos

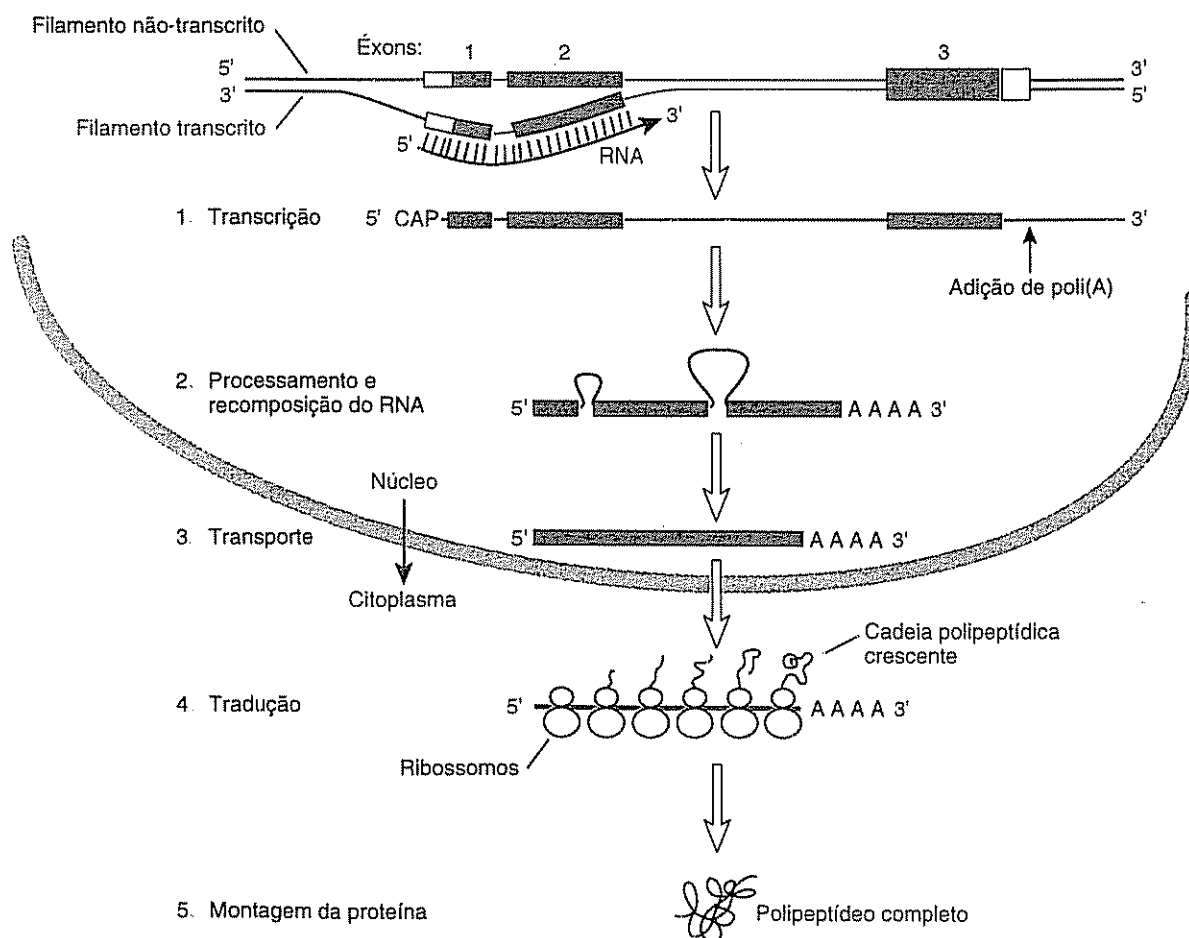



Fig. 3.8 Fluxo de informação do DNA para o RNA para a proteína de um gene hipotético com três éxons e dois íntrons. As etapas incluem transcrição, processamento e recomposição do RNA, transporte do núcleo para o citoplasma e tradução.

(ou uma variante disto), em geral encontrada na parte 3' não-traduzida do RNA transcrito. Estas modificações pós-transcricionais ocorrem no núcleo, assim como o processamento do RNA. O RNA totalmente processado agora é chamado de mRNA e é transportado para o citoplasma, onde ocorre a tradução (ver Fig. 3.8).

Tradução e o Código Genético

No citoplasma, o mRNA é traduzido em proteína pela ação de uma variedade de moléculas de tRNA, cada uma específica para um determinado aminoácido. Estas moléculas, cada uma com apenas de 70 a 100 nucleotídeos de tamanho, têm a função de transferir os aminoácidos corretos para suas posições ao longo do molde de mRNA, para que sejam adicionados à cadeia polipeptídica crescente. A síntese de proteínas ocorre nos ribossomos, complexos macromoleculares feitos de rRNA (codificados pelos genes de rRNA 18S e 28S) e várias dúzias de proteínas ribossomiais (ver Fig. 3.8).

A chave para a tradução é um código que relaciona aminoácidos específicos a combinações de três bases adjacentes ao longo do mRNA. Cada conjunto de três bases constitui um **códon** específico para um determinado aminoácido (Quadro 3.1). Em teoria, são possíveis variações quase infinitas na disposição das bases ao longo de uma cadeia polinucleotídica. Em qualquer posição existem quatro possibilidades (A, T, C ou G). Assim, existem 4^n combinações possíveis em uma seqüência de n bases. Para três bases, há 4^3, ou 64, combinações possíveis de trincas. Estes 64 códons constituem o **código genético**.

Como existem apenas 20 aminoácidos e 64 possíveis códons, a maioria dos aminoácidos é especificada por mais de um códon. Por isto o código é dito **degenerado**. Por exemplo, a base na terceira posição da trinca pode ser uma purina (A ou G), ou uma pirimidina (T ou C) ou, em alguns casos, qualquer uma das quatro bases, sem alterar a mensagem codificada (ver Quadro 3.1). A leucina e arginina são especificadas por seis códons. Apenas a metionina e o triptofano são cada um deles especificado por um único códon. Três dos códons são chamados de **códons finalizadores** (ou **sem sentido**) porque designam o término da tradução do mRNA neste ponto.

A tradução de um mRNA processado é sempre iniciada em um códon que especifica metionina. A metionina é, portanto, o primeiro aminoácido codificado (amino-terminal) de cada cadeia polipeptídica, embora em geral seja removido antes que a síntese da proteína esteja completa. O códon para metionina (o códon

QUADRO 3–1

O Código Genético

Primeira Base	Segunda Base: *U*		*C*		*A*		*G*		Terceira Base
U	UUU	fen	UCU	ser	UAU	tir	UGU	cis	U
	UUC	fen	UCC	ser	UAC	tir	UGC	cis	C
	UUA	leu	UCA	ser	UAA	fim	UGA	fim	A
	UUG	leu	UCG	ser	UAG	fim	UGG	trp	G
C	CUU	leu	CCU	pro	CAU	his	CGU	arg	U
	CUC	leu	CCC	pro	CAC	his	CGC	arg	C
	CUA	leu	CCA	pro	CAA	gln	CGA	arg	A
	CUG	leu	CCG	pro	CAG	gln	CGG	arg	G
A	AUU	ile	ACU	tre	AAU	asn	AGU	ser	U
	AUC	ile	ACC	tre	AAC	asn	AGC	ser	C
	AUA	ile	ACA	tre	AAA	lis	AGA	arg	A
	AUG	met	ACG	tre	AAG	lis	AGG	arg	G
G	GUU	val	GCU	ala	GAU	asp	GGU	gli	U
	GUC	val	GCC	ala	GAC	asp	GGC	gli	C
	GUA	val	GCA	ala	GAA	glu	GGA	gli	A
	GUG	val	GCG	ala	GAG	glu	GGG	gli	G

Abreviações dos aminoácidos:

ala (A)	alanina	leu (L)	leucina
arg (R)	arginina	lis (K)	lisina
asn (N)	asparagina	met (M)	metionina
asp (D)	ácido aspártico	fem (F)	fenilalanina
cis (C)	cisteína	pro (P)	prolina
gln (Q)	glutamina	ser (S)	serina
glu (E)	ácido glutâmico	tre (T)	treonina
gli (G)	glicina	trp (W)	triptofano
his (H)	histidina	tir (Y)	tirosina
ile (I)	isoleucina	val (V)	valina

Outra abreviação:

fim — códon finalizador

Os códons são mostrados em termos do mRNA, que são complementares aos códons correspondentes no DNA

iniciador, AUG) estabelece a **matriz de leitura** do mRNA. Cada códon subseqüente é lido, por sua vez, para prever a seqüência de aminoácidos da proteína.

As ligações moleculares entre os códons e os aminoácidos são as moléculas específicas de tRNA. Um determinado sítio de cada tRNA forma um **anticódon** com três bases que é complementar a um códon específico no mRNA. A ligação entre o códon e o anticódon coloca o aminoácido apropriado na posição seguinte no ribossomo para a ligação pela formação de uma ligação peptídica com a ponta carboxila e a cadeia polipeptídica crescente. O ribossomo então desliza ao longo do mRNA a cada três bases, alinhando o códon seguinte para o reconhecimento por outro tRNA com o aminoácido seguinte. Assim, as proteínas são sintetizadas a partir de seu terminal amino até o terminal carboxila, que corresponde à tradução do mRNA no sentido 5' para 3'.

Como mencionado antes, a tradução termina quando um códon finalizador (UGA, UAA ou UAG) é encontrado na mesma matriz de leitura que o códon iniciador. (Os códons finalizadores em uma das matrizes de leitura não são lidos e, portanto, não têm efeito na tradução.) O polipeptídeo completo é então liberado do ribossomo, que se torna disponível para começar a síntese de outra proteína.

Processamento Pós-traducional

Muitas proteínas sofrem amplas modificações pós-traducionais. A cadeia polipeptídica que é o produto primário da tradução é dobrada e associada em uma estrutura tridimensional específica que é determinada pela própria seqüência de aminoácidos. Duas ou mais cadeias polipeptídicas, produtos do mesmo gene ou de genes diferentes, podem se combinar para formar um único complexo proteico final. Por exemplo, duas cadeias de α-globina e duas cadeias de β-globina associam-se de modo não convalente para formar a molécula tetramérica de hemoglobina $\alpha_2\beta_2$. Os produtos proteicos também podem ser modificados quimicamente por, por exemplo, adição de fosfato ou carboidratos em sítios específicos. Outras modificações podem envolver a clivagem da proteína, seja para remover seqüências amino-terminais específicas após terem direcionado uma proteína para o seu local correto dentro da célula (p. ex., proteínas que funcionam dentro do núcleo ou mitocôndrias) ou para dividir a molécula em cadeias polipeptídicas menores. Por exemplo, as duas cadeias que constituem a molécula de insulina, uma com 21 e a outra com 30 aminoácidos, originalmente são parte de uma tradução primária com 82 aminoácidos, chamada de pró-insulina.

A Expressão Gênica em Ação: O Gene de Beta-Globina

O fluxo de informações destacado nas seções anteriores pode ser mais bem apreciado com relação a um gene particularmente bem estudado, o gene de β-globina. A cadeia de β-globina é um polipeptídeo com 146 aminoácidos, codificada por um gene que ocupa aproximadamente 1,6 kb no braço curto do cromossomo 11. O gene tem três éxons e dois íntrons (ver Fig. 3.6). O gene de β-globina, bem como outros genes no grupo de β-globina (ver Fig. 3.7), é transcrito em uma direção do centrômero para o telômero. Esta orientação, entretanto, é diferente para outros genes no genoma e depende de qual filamento da dupla hélice cromossômica é o filamento codificante de um determinado gene.

As seqüências de DNA necessárias para uma iniciação precisa da transcrição do gene de β-globina estão situadas no promotor em cerca de 200 pares de bases antecedentes ao ponto de início da transcrição. A seqüência de dupla hélice de DNA desta região do gene de β-globina, a seqüência correspondente de RNA e a seqüência traduzida dos 10 primeiros aminoácidos são mostradas na Fig. 3.9 para ilustrar as relações entre estes três níveis de informação. Como mencionado antes, é o filamento 3' para 5' do DNA que serve como molde e é transcrito, mas é o filamento 5' para 3' do DNA que corresponde mais diretamente à seqüência 5' para 3' do mRNA (e, de fato, é idêntica a ele, exceto por U substituindo T). Devido à sua correspondência, o filamento 5' para 3' do DNA de um gene (o filamento que *não é* transcrito) é o filamento em geral relatado na literatura científica ou nos bancos de dados.

De acordo com esta convenção, a seqüência completa de aproximadamente 2,0 kb do cromossomo 11 que inclui o gene de β-globina é mostrada na Fig. 3.10. (Vale a pena refletir que esta página de nucleotídeos representa apenas 0,000067% da seqüência de todo o genoma humano). Dentro destes 2,0 kb está contida a maioria dos elementos de seqüência necessários para codificar e regular a expressão deste gene, mas não todos. Na Fig. 3.10 são indicadas muitas das características importantes do gene de β-globina, incluindo os elementos de seqüência promotora conservados, os limites de íntrons e éxons, os sítios de corte do RNA, os códons iniciadores e finalizadores e o sinal de poliadenilação, todos os quais são conhecidos como estando mutados em vários defeitos herdados do gene de β-globina (ver Cap. 11).

Início da Transcrição

O promotor de β-globina, como muitos outros promotores gênicos, consiste em uma série de elementos funcionais relati-

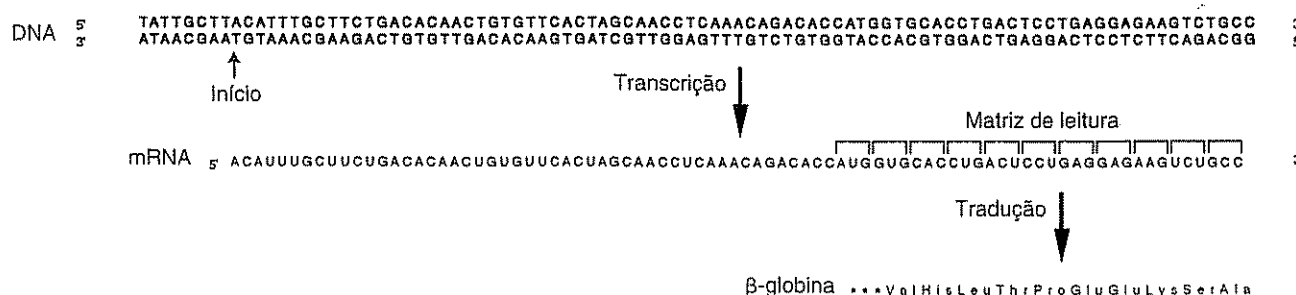



Fig. 3.9 Estrutura da seqüência de nucleotídeos da ponta 5' do gene humano de β-globina no braço curto do cromossomo 11. A transcrição do filamento 3' para 5' (*inferior*) começa no ponto indicado para produzir o mRNA de β-globina. A matriz de leitura traducional é determinada pelo códon iniciador AUG (***); os códons subseqüentes que especificam aminoácidos são indicados em vermelho. As outras duas matrizes potenciais não são usadas

cromossomos humanos. Como vimos na seção anterior, *cada cromossomo é tido como consistindo em uma única dupla hélice contínua de DNA*. Isto é, cada cromossomo no núcleo é uma longa molécula bifilamentar e linear de DNA. Os cromossomos não são duplas hélices nuas de DNA. A molécula de DNA de um cromossomo existe como um complexo, com uma família de proteínas cromossômicas básicas chamadas histonas e com um grupo heterogêneo de proteínas não-histônicas ácidas que não são tão bem caracterizadas, mas que parecem ser cruciais para o estabelecimento de um ambiente apropriado para garantir o comportamento normal dos cromossomos e a expressão apropriada dos genes. Em conjunto, este complexo de DNA e proteínas, é chamado de **cromatina.**

Existem cinco tipos principais de histonas que têm um papel crucial no acondicionamento da fibra de cromatina. Duas cópias de cada uma das quatro histonas cerne H2A, H2B, H3 e H4 constituem um octâmero, ao redor do qual se enrola um segmento da dupla hélice de DNA (Fig. 3.11). Cerca de 140 pares de base do DNA estão associados a cada cerne de histona, dando quase duas voltas ao redor do octâmero. Depois de um curto segmento (de 20 a 60 pares de bases) "espaçador" de DNA, forma-se um novo complexo de DNA, e assim por diante, dando à cromatina um aspecto de contas em um colar. Cada complexo de DNA com histonas cerne é chamado de um **nucleossomo**, que é a unidade estrutural básica da cromatina. A quinta histona, a H1, parece ligar-se ao DNA em seguida a cada nucleossomo, na região espaçadora internucleossômica. A quantidade de DNA associada ao cerne de nucleossomo, juntamente com a região espaçadora, tem cerca de 200 pares de bases.

Durante o ciclo celular, como vimos no Cap. 2, os cromossomos passam por etapas ordenadas de condensação e descondensação (ver Fig. 2.5). No núcleo interfásico, os cromossomos e a cromatina estão bem descondensados em relação ao estado altamente condensado da cromatina na metáfase. Entretanto, mesmo nos cromossomos interfásicos, o DNA na cromatina está substancialmente mais condensado do que estaria como uma dupla hélice nativa, livre de proteínas.

Os longos filamentos de nucleossomos estão eles próprios mais compactados em uma estrutura secundária helicoidal de cromatina do que parece ao microscópio eletrônico, como uma fibra espessa de 30 nm (aproximadamente três vezes mais grossa que a fibra nucleossômica) (ver Fig. 3.11). Esta fibra "solenóide" (do grego *solenoeides*, "em forma de tubo") cilíndrica parece ser a unidade fundamental da organização da cromatina. Os solenóides são compactados em **alças** ou domínios ligados a intervalos de cerca de 100 kb a um **arcabouço** não-histônico de proteína ou matriz. Tem-se especulado que as alças são, de fato, unidades funcionais de replicação do DNA ou de transcrição gênica, ou ambos, e que os pontos de ligação de cada alça são fixados ao longo do DNA cromossômico. Assim, um nível de controle da expressão gênica pode depender de como o DNA e os genes são acondicionados nos cromossomos e de sua associação a proteínas da cromatina no processo de acondicionamento.

Os vários níveis hierárquicos de acondicionamento vistos em um cromossomo interfásico são ilustrados esquematicamente na Fig. 3.11. A enorme quantidade de DNA embalada em um cromossomo pode ser apreciada quando os cromossomos são tratados para remover a maioria das proteínas da cromatina a fim de se observar o arcabouço proteico (Fig. 3.12). Quando o DNA é liberado pelos cromossomos tratados deste modo, longas alças de DNA podem ser vistas, e o arcabouço residual pode ser visto reproduzindo uma estrutura de um típico cromossomo metafásico.

Fig. 3.11 Níveis hierárquicos de acondicionamento da cromatina em um cromossomo humano

vamente curtos que são tidos como interagindo com proteínas específicas (em geral chamadas de **fatores de transcrição**) que regulam a transcrição, incluindo, no caso dos genes de globina, as proteínas que restringem a expressão destes genes a células eritróides, as células nas quais é produzida a hemoglobina. Uma seqüência promotora importante é o "TATA boxe", uma região conservada rica em adeninas e timinas que está cerca de 25 a 30 pares de bases antecedendo o ponto de início da transcrição (ver Figs. 3.6 e 3.10). O TATA boxe parece ser importante para a determinação da posição do início da transcrição, que no gene de β-globina está aproximadamente a 50 pares de bases antecedentes ao ponto de início da tradução (ver Fig. 3.9). Assim, neste gene existem cerca de 50 pares de bases de seqüência que são transcritos mas não são traduzidos. Em outros genes, esta região 5' transcrita mas não traduzida (chamada de 5' UTR) pode ser muito maior e, de fato, pode ser interrompida por um ou mais íntrons. Uma segunda região conservada, o chamado CAT boxe (na verdade, CCAAT), está antecedente há algumas dezenas de pares de bases (ver Fig. 3.10). Tanto as mutações experimentalmente induzidas quanto aquelas de ocorrência natural em um destes elementos de seqüência, bem como em outras seqüências reguladoras mais antecedentes, levam a uma intensa redução no nível de transcrição, demonstrando assim a importância destes elementos para a expressão normal do gene. Muitas mutações nestes elementos reguladores foram identificadas em pacientes com o distúrbio β-talassemia (ver Cap. 11).

Nem todos os promotores gênicos contêm os dois elementos específicos descritos. Em particular, os genes que são expressos constitutivamente na maioria ou em todos os tecidos (chamados de "genes de manutenção" [*housekeeping genes*]) em geral não têm o CAT e TATA boxes, que são mais típicos de genes histoespecíficos. Os promotores de muitos genes de manutenção em geral contêm uma alta proporção de citosinas e guaninas em relação ao DNA circundante (ver o promotor do gene de hipoxantina fosforibosiltransferase na Fig. 3.6). Tais promotores ricos em CG em geral estão situados nas regiões do genoma chamadas de **ilhas de CG** (ou de **CpG**), assim chamadas em função da alta concentração do dinucleotídeo 5'-CG-3' que fica fora da região cromossômica mais geral rica em AT. Algumas das seqüências ricas em CG encontradas nestes promotores são tidas como servindo como pontos de ligação para fatores específicos de transcrição.

Em adição às seqüências que constituem o próprio promotor, existem outros elementos de seqüência que podem alterar muito a eficiência da transcrição. As mais bem caracterizadas destas seqüências "ativadoras" são chamadas de **acentuadores** (*enhancers*). Os acentuadores são elementos de seqüência que podem agir à distância (em geral vários kb) de um gene para estimular a transcrição. Ao contrário dos promotores, os acentuadores são independentes de posição e orientação e podem estar localizados a 5' ou a 3' do ponto de início da transcrição. Os elementos acentuadores funcionam apenas em alguns tipos de células e, portanto, parecem estar envolvidos no estabelecimento da especificidade tissular e/ou o nível de expressão de muitos genes, em conjunto com um ou mais fatores de transcrição. No caso do gene de β-globina, vários acentuadores histoespecíficos estão presentes dentro do próprio gene e em suas regiões flanqueadoras. A interação de acentuadores com determinadas proteínas leva a níveis aumentados de transcrição.

A expressão normal do gene de β-globina durante o desenvolvimento também requer uma seqüência mais distante, chamada de **região controladora de locus (LCR)** e situada antecedendo o gene de ε-globina (ver Fig. 3.7), que é necessária para a expressão apropriada em alto nível. Como esperado, as mutações que perturbam ou deletam as seqüências acentuadoras ou LCR interferem ou impedem a expressão do gene de β-globina (ver Cap. 11).

Recomposição do RNA

O transcrito primário de RNA do gene de β-globina contém dois éxons, cerca de 100 e 850 pares de base de tamanho, que precisam ser reunidos. O processo é exato e muitíssimo eficiente. Noventa e cinco por cento dos transcritos de β-globina são tidos como sendo recompostos precisamente para gerar um mRNA funcional de globina. As reações de recomposição são guiadas por seqüências específicas tanto nas pontas 5' quanto nas pontas 3' dos íntrons. A seqüência 5' consiste em nove nucleotídeos, dos quais dois (o dinucleotídeo GT, situado no íntron imediatamente adjacente ao ponto de corte) são virtualmente invariantes entre os pontos de corte em genes diferentes (ver Fig. 3.10). A seqüência 3' consiste em cerca de uma dúzia de nucleotídeos, dos quais, mais uma vez, dois, os AG situados imediatamente a 5' do limite íntron/éxon, são obrigatórios para a recomposição normal. Os próprios pontos de corte não estão relacionados com a matriz de leitura do mRNA em particular. Em alguns casos, como no do íntron 1 do gene de β-globina, o íntron corta um códon específico (ver Fig. 3.10).

A importância médica da recomposição do RNA é ilustrada pelo fato de que as mutações dentro das seqüências conservadas nos limites íntron/éxon comumente prejudicam a recomposição do RNA, com a redução concomitante da quantidade de mRNA final normal de β-globina; as mutações nos dinucleotídeos GT ou AG mencionadas antes invariavelmente eliminam a remoção normal do íntron contendo a mutação. Várias mutações de sítio de corte, identificadas em pacientes com β-talassemia, serão discutidas em detalhes no Cap. 11.

Poliadenilação

O mRNA final de β-globina contém aproximadamente 130 pares de bases do material de 3' não-traduzido (3' UTR) entre o códon finalizador e o local da cauda poliA (ver Fig. 3.10). Como em outros genes, a clivagem da ponta 3' do mRNA e a adição da cauda poliA é controlada, pelo menos em parte, por uma seqüência AAUAAA de cerca de 20 pares de bases antes do sítio de poliadenilação. As mutações neste sinal de poliadenilação nos pacientes com β-talassemia (bem como mutações no sinal de poliadenilação correspondente no gene de α-globina nos pacientes com α-talassemia) documentam a importância deste sinal para a clivagem apropriada em 3' e a poliadenilação (ver Cap. 11). A região 3' não-traduzida de alguns genes pode ser bem longa, de até vários kb. Outros genes têm vários sítios de poliadenilação alternativa, e a seleção entre eles pode influenciar a estabilidade do mRNA resultante e, portanto, o estado de equilíbrio de cada mRNA.

ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS HUMANOS

A composição de genes no genoma humano, bem como os determinantes de sua expressão, é especificada no DNA dos 46

cromossomos humanos. Como vimos na seção anterior, *cada cromossomo é tido como consistindo em uma única dupla hélice contínua de DNA*. Isto é, cada cromossomo no núcleo é uma longa molécula bifilamentar e linear de DNA. Os cromossomos não são duplas hélices nuas de DNA. A molécula de DNA de um cromossomo existe como um complexo, com uma família de proteínas cromossômicas básicas chamadas histonas e com um grupo heterogêneo de proteínas não-histônicas ácidas que não são tão bem caracterizadas, mas que parecem ser cruciais para o estabelecimento de um ambiente apropriado para garantir o comportamento normal dos cromossomos e a expressão apropriada dos genes. Em conjunto, este complexo de DNA e proteínas, é chamado de **cromatina**.

Existem cinco tipos principais de histonas que têm um papel crucial no acondicionamento da fibra de cromatina. Duas cópias de cada uma das quatro histonas cerne H2A, H2B, H3 e H4 constituem um octâmero, ao redor do qual se enrola um segmento da dupla hélice de DNA (Fig. 3.11). Cerca de 140 pares de base do DNA estão associados a cada cerne de histona, dando quase duas voltas ao redor do octâmero. Depois de um curto segmento (de 20 a 60 pares de bases) "espaçador" de DNA, forma-se um novo complexo de DNA, e assim por diante, dando à cromatina um aspecto de contas em um colar. Cada complexo de DNA com histonas cerne é chamado de um **nucleossomo**, que é a unidade estrutural básica da cromatina. A quinta histona, a H1, parece ligar-se ao DNA em seguida a cada nucleossomo, na região espaçadora internucleossômica. A quantidade de DNA associada ao cerne de nucleossomo, juntamente com a região espaçadora, tem cerca de 200 pares de bases.

Durante o ciclo celular, como vimos no Cap. 2, os cromossomos passam por etapas ordenadas de condensação e descondensação (ver Fig. 2.5). No núcleo interfásico, os cromossomos e a cromatina estão bem descondensados em relação ao estado altamente condensado da cromatina na metáfase. Entretanto, mesmo nos cromossomos interfásicos, o DNA na cromatina está substancialmente mais condensado do que estaria como uma dupla hélice nativa, livre de proteínas.

Os longos filamentos de nucleossomos estão eles próprios mais compactados em uma estrutura secundária helicoidal de cromatina do que parece ao microscópio eletrônico, como uma fibra espessa de 30 nm (aproximadamente três vezes mais grossa que a fibra nucleossômica) (ver Fig. 3.11). Esta fibra "solenóide" (do grego *solenoeides*, "em forma de tubo") cilíndrica parece ser a unidade fundamental da organização da cromatina. Os solenóides são compactados em **alças** ou domínios ligados a intervalos de cerca de 100 kb a um **arcabouço** não-histônico de proteína ou matriz. Tem-se especulado que as alças são, de fato, unidades funcionais de replicação do DNA ou de transcrição gênica, ou ambos, e que os pontos de ligação de cada alça são fixados ao longo do DNA cromossômico. Assim, um nível de controle da expressão gênica pode depender de como o DNA e os genes são acondicionados nos cromossomos e de sua associação a proteínas da cromatina no processo de acondicionamento.

Os vários níveis hierárquicos de acondicionamento vistos em um cromossomo interfásico são ilustrados esquematicamente na Fig. 3.11. A enorme quantidade de DNA embalada em um cromossomo pode ser apreciada quando os cromossomos são tratados para remover a maioria das proteínas da cromatina a fim de se observar o arcabouço proteico (Fig. 3.12). Quando o DNA é liberado pelos cromossomos tratados deste modo, longas alças de DNA podem ser vistas, e o arcabouço residual pode ser visto reproduzindo uma estrutura de um típico cromossomo metafásico.

Fig. 3.11 Níveis hierárquicos de acondicionamento da cromatina em um cromossomo humano

Fig. 3.12 Micrografia eletrônica de um cromossomo metafásico sem proteína. mostrando o arcabouço cromossômico residual e as alças do DNA As fibras individuais do DNA podem ser mais bem visualizadas nas margens das alças de DNA Barra = 2μ (De Paulson J R. Laemmli U K [1977] The structure of histone-depleted metaphase chromosomes Cell 12:817-828 Reimpresso com permissão dos autores e Cell Press)

O Cromossomo Mitocondrial

Um subgrupo pequeno mas importante de genes codificados no genoma humano reside nas mitocôndrias do citoplasma. Os genes mitocondriais exibem herança exclusivamente materna (ver Cap. 5). As células humanas têm centenas de mitocôndrias, cada uma delas contendo várias cópias de uma pequena molécula circular, o cromossomo mitocondrial. A molécula de DNA mitocondrial tem apenas 16 kb de tamanho (menos de 0,03% do menor cromossomo nuclear!) e codifica apenas algumas dezenas de genes. Embora os produtos destes genes funcionem nas mitocôndrias, deve-se destacar que a grande maioria das proteínas encontradas nas mitocôndrias são, de fato, os produtos de genes nucleares. As mutações nos genes mitocondriais foram demonstradas em vários distúrbios herdados maternamente, bem como distúrbios esporádicos (ver Cap. 12).

ORGANIZAÇÃO DO GENOMA HUMANO

As regiões do genoma com características similares ou organização, replicação e expressão não são dispostas aleatoriamente, mas sim tendem a ser agrupadas. Esta organização funcional do genoma está muito bem correlacionada com sua organização estrutural, como revelado pelo bandeamento dos cromossomos metafásicos (introduzido no Cap. 2 e discutido em detalhes no Cap. 9). O significado geral desta organização funcional é que os cromossomos não são uma coleção aleatória de tipos diferentes de genes e outras seqüências de DNA. Algumas regiões cromossômicas, ou mesmo cromossomos inteiros, são ricas em conteúdo gênico, enquanto outras não são. Alguns tipos de seqüências são característicos de diferentes marcos físicos de cromossomos humanos. As conseqüências clínicas das anomalias de estrutura do genoma refletem a natureza específica dos genes e as seqüências envolvidas. Assim, as anomalias dos cromossomos ricos em genes ou regiões cromossômicas tendem a ser muito mais graves clinicamente do que os defeitos similares envolvendo partes do genoma pobres em genes.

À medida que o Projeto do Genoma Humano vai ficando quase completo, torna-se aparente que a organização do DNA no genoma humano é muito mais complexa do que foi antecipado, como ilustra a Fig. 3.13 para a região totalmente caracterizada do cromossomo 17 na vizinhança do gene *BRCA1*, cujas mutações são responsáveis por algumas formas de câncer de mama familiar (ver Cap. 16). Do DNA genômico, menos de 10% codifica genes. Apenas de metade a três quartos do tamanho linear total do genoma consiste no chamado **DNA de cópia única** ou **DNA único**, isto é, DNA cuja seqüência de nucleotídeos é representada apenas uma vez (ou, no máximo, algumas vezes) por genoma haplóide. O resto do genoma consiste em várias classes de **DNA repetitivo** e inclui DNA cuja seqüência de nucleotídeos é repetida, seja perfeitamente ou com alguma variação, de centenas a milhares de vezes no genoma. Embora a maioria (mas não todos) dos 50.000 genes estimados no genoma esteja representada como DNA de cópia única, as seqüências na fração de DNA repetitivo contribuem para manter a estrutura cromossômica.

Seqüências de DNA de Cópia Única

Embora o DNA de cópia única constitua a maior parte do DNA no genoma, grande parte de sua função permanece um mistério, pois, como mencionado, as seqüências que de fato codificam proteínas (a parte codificante dos genes) constituem apenas uma pequena porção de todas as cópias únicas do DNA. Longos trechos de seqüências de DNA único (> 25 kb) são bem raros no genoma. A maioria do DNA de cópia única é encontrada em pequenos trechos (vários kb ou menos), intercalados com membros de várias famílias de DNA repetitivo (ver Fig. 3.13).

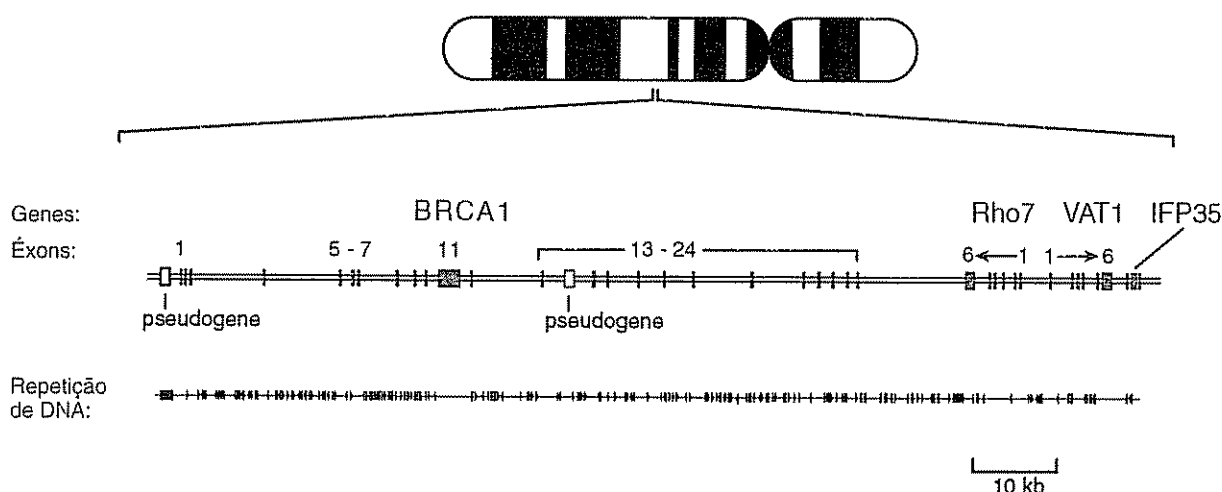



Fig. 3.13 Organização seqüencial da região do genoma humano próxima ao gene *BRCA1*, que é responsável por alguns casos de câncer de mama familiar de início precoce. São encontrados quatro genes e dois pseudogenes nesta seqüência de 117 kb do cromossomo 17, e suas localizações e estruturas são indicadas acima do cromossomo. Quase metade da seqüência consiste em vários elementos repetitivos intercalados, incluindo 170 cópias das repetições *Alu* e 8 cópias das repetições L1 que são indicadas abaixo do cromossomo. *BRCA1* contém um promotor rico em GC, com vários sítios de ligação de fatores de transcrição específicos. O gene *RHO7* codifica um membro da família de proteínas de ligação de GTP. *VAT1* codifica uma proteína de membrana encontrada nas vesículas sinápticas. Tanto *RHO7* quanto *VAT1* também têm promotores ricos em GC. *IFP35* codifica uma proteína cuja expressão pode ser induzida por interferon. (Baseada em Smith T. M., Lee M. K., Szabo C. I. *et al.* [1996] Complete genomic sequence and analysis of 117 kb human DNA containing the gene *BRCA1*. Genome Research 6:1029-1049.)

Famílias de DNA Repetitivo

Várias categorias diferentes de DNA repetitivo são reconhecidas. Uma característica distinta útil é se as seqüências repetidas ("repetições") estão agrupadas em um ou alguns poucos locais ou se estão dispersas pelo genoma, intercaladas com seqüências de cópia única ao longo do cromossomo. As seqüências repetidas agrupadas constituem de 10% a 15% do genoma e consistem em arranjos de várias repetições curtas organizadas em tandem. Os diferentes tipos de tais repetições em tandem são coletivamente chamados de **DNA satélite**, assim denominados porque muitas das famílias de repetições originais em tandem podiam ser purificadas por densidade de centrifugação do resto do genoma como frações "satélite" do DNA.

As famílias de DNA satélite variam com relação ao seu local no genoma, ao tamanho total da disposição em tandem e ao comprimento das unidades repetidas constituintes do agrupamento. Em geral, os arranjos-satélites podem ter vários milhões de pares de bases ou mais de tamanho e constituir até vários por cento do conteúdo de DNA de um cromossomo humano. Muitas seqüências-satélites são importantes como ferramentas moleculares que revolucionaram a análise citogenética clínica em função de sua relativa facilidade de detecção (ver Cap. 9). Algumas seqüências-satélites humanas são baseadas nas repetições (com alguma variação) de uma seqüência curta, tal como um pentanucleotídeo. Longas disposições de tais repetições são encontradas nas regiões heterocromáticas nos braços longos proximais dos cromossomos 1, 9 e 16 e em quase todo o braço longo do cromossomo Y (ver Cap. 9). Outros DNAs satélites são baseados em repetições um pouco mais longas. Por exemplo, a família α-satélite de DNA é composta de disposições em tandem de cópias diferentes de uma unidade de aproximadamente 171 pares de bases, encontrada na região centromérica de cada cromossomo humano. Esta família de repetições é tida como tendo um papel na função do centrômero, garantindo a segregação cromossômica apropriada na mitose e na meiose.

Além do DNA satélite, outra classe importante de DNA repetitivo no genoma consiste em seqüências relacionadas que são dispersas pelo genoma em vez de localizadas (ver Fig. 3.13). Embora muitas famílias de DNA pequeno atendam a esta descrição geral, duas em particular garantem a discussão porque juntas constituem uma porção significativa do genoma e porque foram implicadas em doenças genéticas. Os mais bem estudados elementos repetitivos dispersos pertencem à chamada **família *Alu***. Os membros desta família têm cerca de 300 pares de bases de tamanho e são reconhecivelmente relacionados uns aos outros, embora não sejam iguais em seqüência. No total, existem cerca de 500.000 membros da família *Alu* no genoma, constituindo pelo menos vários por cento do DNA humano. Em algumas regiões do genoma, entretanto, incluindo aquela próxima ao gene *BRCA1* como visto na Fig. 3.13, eles constituem uma porcentagem muito mais alta do DNA. Uma segunda família importante de DNA repetitivo disperso é chamada de **família L1**. Os elementos L1 são seqüências longas e repetitivas (de até 6 kb de tamanho) que são encontrados em cerca de 100.000 cópias por genoma. Eles são abundantes em algumas regiões do genoma, mas relativamente esparsos em outras.

As famílias de repetições dispersas pelo genoma são claramente de importância médica. Tanto as seqüências *Alu* quanto as L1 foram implicadas como a causa de mutações em doenças hereditárias pelo processo de retrotransposição, introduzido em uma seção anterior. Pelo menos algumas cópias das famílias L1 e *Alu* ainda são transposicionalmente ativas e geram cópias de si mesmas que podem se integrar em outras partes do genoma, ocasionalmente causando inativação insercional de um gene importante em termos médicos. A freqüência dos eventos de retrotransposição que causam doenças genéticas em seres humanos atualmente é desconhecida, mas eles podem contribuir com até 1 em 500 mutações. Além disso, os eventos de recombinação aberrante entre cópias diferentes de repetições dispersas também podem ser uma causa de mutação em algumas doenças genéticas (ver Cap. 6).

VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA E SUA RELEVÂNCIA PARA A MEDICINA

A expressão regulada dos cerca de 50.000 genes codificados nos cromossomos humanos envolve um conjunto de inter-relações complexas entre níveis diferentes de controle, incluindo a dosagem gênica apropriada (controlada por mecanismos de replicação cromossômica e segregação), a estrutura gênica e, finalmente, a transcrição, a estabilidade do mRNA, a tradução, o processamento de proteínas e a degradação de proteínas. Para alguns genes, as flutuações no nível de produto gênico funcional, devidas ou à variação herdada na estrutura de um determinado gene ou às mudanças induzidas por fatores não-genéticos tais como dieta ou o ambiente, são relativamente de pouca importância. Para outros genes, as mudanças no nível de expressão podem ter conseqüências clínicas, refletindo a importância destes produtos gênicos em determinadas vias biológicas. A natureza da variação herdada na estrutura e na função dos cromossomos e genes, bem como a influência desta variação na expressão de características específicas, é a própria essência da genética médica e molecular e será tratada nos capítulos subseqüentes.

Referências Gerais

Abel T, Maniatis T (1994) Mechanisms of eukaryotic gene regulation. *In* Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H, (eds) The Molecular Basis of Blood Diseases. WB Saunders, Philadelphia. pp 33–70.

Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. (1994) Molecular Biology of the Cell, 3rd ed Garland Publishing, New York.

Bernardi G (1995) The human genome, organization, and evolutionary history. Ann Rev Genet 29:445–476

Lewin B (2000) Genes VII, 7th ed Oxford University Press, Oxford, England.

Semenza G (1999) Transcription Factors and Human Disease. Oxford University Press, New York.

Singer M, Berg P (1997) Exploring Genetic Mechanisms University Science Books, Sausalito, California.

Wolffe A (1998) Chromatin Structure and Function, 3rd ed Academic Press, San Diego

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Berg P (1981) Dissections and reconstructions of genes and chromosomes (Nobel Prize lecture) Science 213:296–303

Kazazian HH, Moran JV (1998) The impact of L1 retrotransposons on the human genome. Nature Genetics 19:19–24.

Lawn RM, Efstratiadis A, O'Connell C, et al (1980) The nucleotide sequence of the human β-globin gene Cell 21:647–651

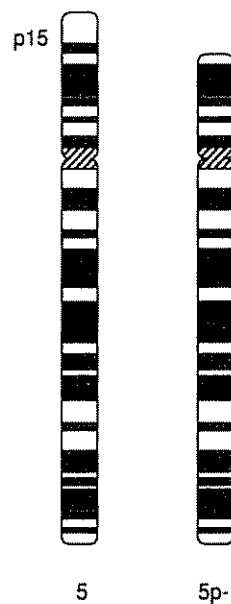
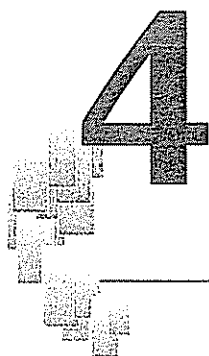
Smith TM, Lee MK, Szabo CI, et al (1996) Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene *BRCA1* Genome Research 6:1029–1049.

Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse Science 283:1482–1488

Problemas

1. As seqüências de aminoácidos que se seguem representam parte de uma proteína. São mostradas a seqüência normal e quatro formas mutantes. Consultando o Quadro 3.1, determine a seqüência bifilamentar da seção correspondente do gene normal. Qual filamento a RNA polimerase irá ler ? Qual seria a seqüência do mRNA resultante? Que tipo de mutação é mais provável que cada proteína mutante represente?
   Normal -lis-arg-his-his-tir-leu-
   Mutante 1 -lis-arg-his-his-cis-leu-
   Mutante 2 -lis-arg-ile-ile-ile-
   Mutante 3 -lis-glu-tre-ser-leu-ser-
   Mutante 4 -asn-tir-leu-

2. Os itens que se seguem estão relacionados uns aos outros de modo hierárquico. Quais são estas relações? Cromossomo, par de bases, nucleossomo, banda G, pares de kb, íntron, gene, éxon, cromatina, códon, nucleotídeo.

3. O desenho esquemático que se segue ilustra um cromossomo 5 no qual a banda mais distal (banda p15) no braço curto está deletada. Este cromossomo deletado está associado à síndrome do *cri du chat* (ver Caps. 9 e 10). Com o que você sabe sobre a organização dos cromossomos e do genoma, aproximadamente quanto DNA foi deletado? Quantos genes?

4. A maior parte do genoma humano consiste em seqüências que não são transcritas e não codificam diretamente produtos gênicos. Para cada um dos que se seguem, considere os modos pelos quais estes elementos genômicos podem contribuir para uma doença humana: íntrons, seqüências repetitivas *Alu* ou L1, regiões controladoras de locus, pseudogenes.

Ferramentas da Genética Molecular Humana

Um dos principais objetivos da genética médica moderna é compreender a base molecular das mutações que levam a uma doença genética e usar esta informação para melhorar os métodos de diagnóstico e tratamento. Os avanços em nossa compreensão da genética molecular têm contribuído consideravelmente para o desenvolvimento de novas e revolucionárias tecnologias que permitem a análise detalhada de genes normais e anormais. A aplicação destas técnicas tem tanto aumentado a compreensão dos processos moleculares em todos os níveis, do gene ao organismo inteiro, quanto apoiado o desenvolvimento de uma ampla gama de procedimentos laboratoriais para a detecção e o diagnóstico das doenças genéticas.

Este capítulo não pretende ser um livro de receitas para experimentos genéticos ou métodos de diagnóstico laboratorial. Ao contrário, serve apenas como uma introdução para as técnicas que têm sido e continuam a ser amplamente responsáveis pelos avanços tanto na pesquisa básica quanto na genética aplicada. Os conteúdos deste capítulo suplementam o material básico apresentado nos Caps. 3 e 5 e fornecem uma base para a compreensão de grande parte da informação genética contida nos capítulos que se seguem. Os leitores que tiveram um curso ou uma experiência laboratorial em genética molecular humana podem usar este capítulo como uma revisão ou pulá-lo inteiramente sem que isso vá interferir na continuidade do texto. Para outros que acham o material deste capítulo muito resumido, as técnicas modernas mais detalhadas, juntamente com referências completas, podem ser encontradas nas Referências Gerais citadas ao final deste capítulo.

ANÁLISE DO DNA INDIVIDUAL E SEQÜÊNCIAS DE RNA

Os geneticistas moleculares enfrentam dois obstáculos fundamentais para desenvolver suas investigações sobre a base molecular das doenças hereditárias. O primeiro obstáculo é obter uma quantidade suficiente de uma seqüência de DNA ou RNA de interesse que permita sua análise, pois em geral cada célula tem apenas duas cópias de um gene e alguns genes podem ser transcritos apenas em certos tecidos ou apenas em pequena quantidade, ou ambos, gerando um pequeno número de moléculas de RNA mensageiro (mRNA). O segundo obstáculo é o de purificar a seqüência de interesse dentre todos os outros segmentos de DNA ou moléculas de mRNA presentes na célula. As últimas três décadas testemunharam uma revolução tecnológica que resolveu tanto os problemas de quantidade quanto os de purificação. Estas duas tecnologias completares são a **clonagem molecular** e a **reação em cadeia da polimerase (PCR)** (Fig. 4.1).

Como muitos avanços tecnológicos, estes possuem seu jargão, cujo domínio pode parecer mais importante que os conceitos envolvidos (ver boxe).

Clonagem Molecular

O processo de **clonagem molecular** envolve a transferência de uma seqüência de DNA de interesse para uma única célula de um microrganismo. O microrganismo é subseqüentemente cultivado, de modo a reproduzir a seqüência de DNA junto com seu próprio complemento de DNA. Grandes quantidades da seqüência de interesse podem ser isoladas em forma pura para uma análise molecular detalhada (ver Fig. 4.1).

Enzimas de Restrição

Um dos principais avanços no desenvolvimento da clonagem molecular foi a descoberta, no início da década de 1970, das **endonucleases de restrição** bacterianas (em geral chamadas de enzimas de restrição), enzimas que reconhecem seqüências bifilamentares específicas no DNA e clivam o DNA no sítio de reconhecimento ou próximo a ele. Por exemplo, a enzima de restrição *Eco*RI reconhece a seqüência específica de seis pares de bases 5'-GAATTC-3' sempre que ela ocorre na molécula bifilamentar de DNA. A enzima cliva o DNA neste sítio introduzindo um corte em cada filamento entre o G e o A adjacente. A clivagem gera dois fragmentos, cada um com quatro bases, com pontas unifilamentares (Fig. 4.2). Tais pontas "adesivas" são úteis para as reações subseqüentes de união na construção de moléculas recombinantes de DNA. Outras enzimas de restrição reconhecem seqüências diferentes de nucleotídeos que são específicas para cada enzima em particular. Hoje são conhecidas mais de 1.000 destas enzimas. Algumas das mais comumente usadas são mostradas no Quadro 4.1. A maioria das enzimas de restrição tem sítios de reconhecimento que consistem em quatro ou seis pares de ba-

A Linguagem da Tecnologia do DNA Recombinante

Biblioteca: uma coleção de clones recombinantes de uma fonte conhecida como contendo o gene, o cDNA ou outras seqüências de DNA de interesse. Em princípio, uma biblioteca pode conter todas as seqüências de DNA ou cDNA representadas na célula, no tecido ou no cromossomo original. Uso: "uma biblioteca de cDNA de músculo" ou "uma biblioteca genômica humana".

Clone: uma molécula de DNA recombinante contendo um gene ou outra seqüência de DNA de interesse. Também, o ato de gerar tal molécula. Uso: "para isolar um clone" ou "para clonar um gene".

DNA Complementar (cDNA): um DNA sintético feito por uma DNA polimerase especial conhecida como transcriptase reversa, que usa o RNA mensageiro (mRNA) como molde. Usado para se referir seja a uma cópia unifilamentar seja a seu derivado bifilamentar. Uso: "um clone de cDNA", "uma biblioteca de cDNA" ou "para isolar um cDNA".

Endonucleases de restrição (enzimas de restrição): enzimas que reconhecem seqüências bifilamentares específicas de DNA e cortam o DNA no sítio de reconhecimento ou próximo a ele. Uso: " uma digestão com enzima de restrição" (ou apenas "uma digestão de restrição") ou "a enzima de restrição *Eco*RI".

Hibridização: o ato de duas moléculas de ácido nucleico complementares e unifilamentares formarem ligações de acordo com as regras de pareamento de bases (A com T ou U, G com C) e se transformarem em uma molécula bifilamentar. Uso: "A sonda hibridizada a um gene."

Hospedeiro: o organismo usado para isolar e propagar uma molécula de DNA recombinante. Em geral uma linhagem da bactéria *Escherichia coli* ou da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Uso: "Em que hospedeiro clonar?"

Inserção: um fragmento de DNA clonado em um determinado vetor. Uso: "Eles purificaram a inserção."

Ligação: o ato de formar ligações fosfodiéster para unir duas moléculas bifilamentares de DNA com a enzima DNA ligase. Uso: " Os fragmentos foram ligados."

Oligonucleotídeo: um filamento curto de ácido nucleico que varia de tamanho desde alguns pares de bases até algumas dezenas de pares de bases, em geral sintetizado quimicamente. Em geral chamado de um "oligo".

***Primers* (para PCR):** dois oligonucleotídeos, um de cada lado de uma seqüência-alvo, de modo a que um dos *primers* seja complementar a um segmento de DNA de um filamento e o outro seja complementar a um segmento de DNA do outro filamento de uma molécula de dupla hélice de DNA. Um par específico de *primers* serve para iniciar a síntese de DNA em uma reação de PCR. Uso: "Fiz *primers* para PCR."

Reação em cadeia da polimerase (PCR): amplificação enzimática de um fragmento de DNA situado entre um par de *primers*. Uso: "fiz uma PCR do fragmento" ou "isolei o fragmento usando PCR".

Sonda: uma molécula de DNA ou RNA clonada, marcada com radioatividade ou outro traçador detectável, usada para identificar suas seqüências complementares por hibridização molecular; também, o ato de usar tal molécula. Uso: "a sonda de β-globina" ou "sondar o DNA de um paciente".

Transferência de Southern: um filtro para o qual o DNA foi transferido, em geral após a digestão com a enzima de restrição e eletroforese em gel para separar as moléculas de DNA por tamanho (assim nomeada em homenagem a quem desenvolveu a técnica, Ed Southern); também, o ato de gerar tal filtro e hibridizá-lo a uma sonda específica. Uso: "sondar uma transferência de Southern" ou "eles fizeram uma Southern".

Transferência Northern: um filtro para o qual o RNA foi transferido após eletroforese em gel para separar as moléculas de RNA por tamanho, assim denominada em comparação à transferência de Southern (ver mais adiante); também, o ato de gerar tal filtro e hibridizá-lo a uma sonda específica. Uso: "sondar uma transferência Northern" ou "fizeram uma Northern".

Transferência Western: um filtro para o qual foi transferida uma molécula de proteína após eletroforese em gel para separar as moléculas de proteínas por tamanho (assim designada como uma brincadeira com o nome de Southern, tal como a Northern); também, o ato de gerar tal filtro e expô-lo a um anticorpo específico. Uso: "sondar uma Western" ou "eles fizeram uma Western".

Vetor: a molécula de DNA na qual o gene ou outro fragmento de DNA de interesse é clonado, capaz de se replicar em um determinado hospedeiro. Os exemplos incluem plasmídeos, bacteriófago lambda, cosmídeos e cromossomos artificiais de leveduras ou bactérias. Uso: "um vetor de clonagem" ou "o vetor cosmídeo".

ses, embora algumas tenham sítios maiores. Em geral, as seqüências são **palíndromos**, isto é, a seqüência de bases no sítio de reconhecimento, lida de 5' para 3', é a mesma em ambos os filamentos.

A clivagem de uma molécula de DNA com uma determinada enzima de restrição digere o DNA em uma coleção característica e reproduzível de fragmentos, os quais refletem a freqüência e a localização de sítios específicos de clivagem. Esta propriedade das enzimas de restrição tem duas implicações importantes e centrais ao seu papel na tecnologia do DNA recombinante e à sua aplicação em genética médica. Primeira, a digestão de amostras do DNA genômico com, por exemplo, a enzima *Eco*RI gera uma coleção de cerca de 1 milhão de fragmentos de *Eco*RI, cada um de um determinado local no genoma. Como *Eco*RI cliva um DNA bifilamentar especificamente em cada 5'-GAATTC-3' que encontra, e como mesmo uma única mudança de base em um potencial sítio de clivagem abole seu reconhecimento e clivagem pela enzima, tal digestão permite que se examine, de fato, esta seqüência particular de seis nucleotídeos em aproximadamente 1 milhão de locais no genoma. (Em média, uma enzima com um sítio de reconhecimento de seis pares de bases deve cortar o DNA humano a cada 4^6 pares de bases, ou uma vez a cada 4 kb. Na realidade, entretanto, tais sítios não estão situados aleatoriamente, refletindo a composição particular de bases e seqüências de diferentes regiões do genoma, e são observados fragmentos de *Eco*RI variando de tamanho desde alguns pares de bases até mais de 1 milhão de pares de bases.)

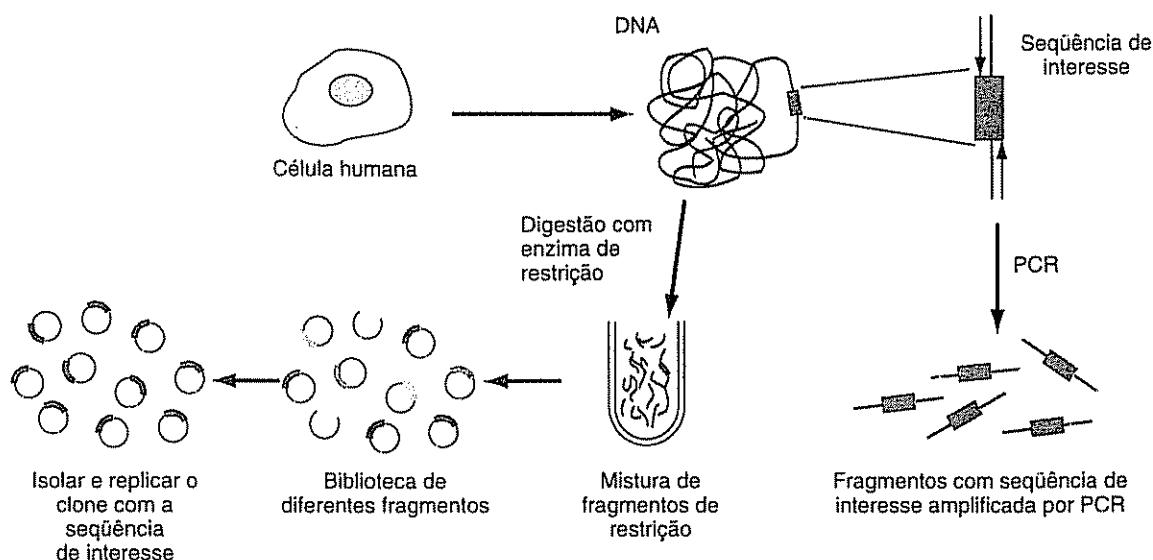



Fig. 4.1 O uso da clonagem molecular e da reação em cadeia da polimerase (PCR) para isolar arbitrariamente grandes quantidades de uma seqüência em particular de DNA de interesse na forma pura

Segunda, todas as moléculas de DNA digeridas com *Eco*RI, não importa sua origem, têm pontas adesivas unifilamentares idênticas, independente da natureza das seqüências de DNA flanqueadoras de um determinado sítio de *Eco*RI. Portanto, *quaisquer* duas moléculas de DNA que tenham sido geradas por digestão com *Eco*RI podem ser unidas *in vitro* pela interação de suas pontas complementares de quatro bases, que é seguida pelo término das seqüências fosfodiéster em cada filamento por uma enzima chamada **DNA ligase**. Esta etapa de ligação cria uma molécula de DNA "recombinante", com uma ponta derivada de uma fonte de DNA e a outra derivada de uma fonte diferente (ver Fig. 4.2). Muitas enzimas de restrição, tais como a *Eco*RI, geram pontas adesivas curtas. Outras, entretanto, cortam ambos os filamentos no mesmo local, deixando pontas retas. A DNA ligase pode unir pontas retas criadas por uma enzima de restrição que corte o DNA sem deixar pontas adesivas.

Vetores

Um vetor é uma molécula de DNA que pode se replicar de modo autônomo em um hospedeiro, tal como uma bactéria ou células de levedura, do qual pode ser subseqüentemente isolado em forma pura para análise. A clonagem de fragmentos de DNA humano em um vetor por meio de enzimas de restrição e DNA ligase, como descrito, permite a propagação de um fragmento clonado juntamente com a molécula vetor. Como os vetores replicantes em geral podem ser obtidos em um alto número de cópias por célula, e como o hospedeiro bacteriano ou de levedura pode ser cultivado indefinidamente no laboratório, podem ser obtidas grandes quantidades de seqüências do DNA de interesse. A habilidade de gerar qualquer número desejado de cópias idênticas (clones) de uma seqüência em particular é um produto **da tecnologia do DNA recombinante**. O nome "DNA recombinante" refere-se a novas combinações de DNA criadas *in vitro* entre seqüências de DNA humano (ou outro) de interesse e moléculas vetores bacterianos (ou outro) capazes de duplicação indefinida dentro de uma linhagem de laboratório de microrganismos. Vários vetores são comumente usados para este fim, cada um com suas vantagens e limitações (Quadro 4.2).

Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas circulares e bifilamentares de DNA que se replicam extracromossomicamente em bactérias ou leveduras. Os plasmídeos usados como vetores são derivados de moléculas circulares de ocorrência natural que foram descobertas primeiro em bactérias porque levavam genes de resistência a antibióticos e podiam ser facilmente passadas de uma bactéria para outra, espalhando assim a resistência a antibióticos com rapidez pela população microbiana. Os plasmídeos especificamente destinados à clonagem molecular em geral são pequenos (vários kb de tamanho) e contêm uma origem de replicação (para se replicar em *Escherichia coli* ou em levedura), um ou mais marcadores selecionáveis (tais como um gene que confere resistência a antibióticos) e um ou mais sítios de restrição que podem ser cortados e usados para a ligação de moléculas exógenas de DNA. Um esquema das etapas importantes envolvidas na clonagem de DNA no sítio de *Eco*RI de um plasmídeo é mostrado na Fig. 4.2. A identificação de colônias que contêm o plasmídeo recombinante desejado, seguida de um crescimento em massa e do isolamento de DNA plasmidial puro, permite o isolamento de grandes quantidades da inserção clonada. A clonagem em plasmídeos é um procedimento padrão para a análise de moléculas pequenas de DNA (ver o Quadro 4.2).

Bacteriófago Lambda

Outro vetor muito usado é o bacteriófago lambda, um vírus bacteriano com uma molécula de DNA bifilamentar relativamente grande (cerca de 45 kb). Após infectar uma *E. coli*, lambda replica-se para produzir grandes números de vírus infecciosos, rompendo a bactéria (lise) e liberando cerca de 1 milhão de bacteriófagos. Cerca de um terço do genoma de bacteriófago não é essencial (indicado como "fragmentos internos" na Fig. 4.3) para o crescimento e a lise e pode ser substituído por outras seqüências de DNA. Assim, o fago lambda é extremamente adequado à clonagem de trechos de DNA humano de até 20 kb.

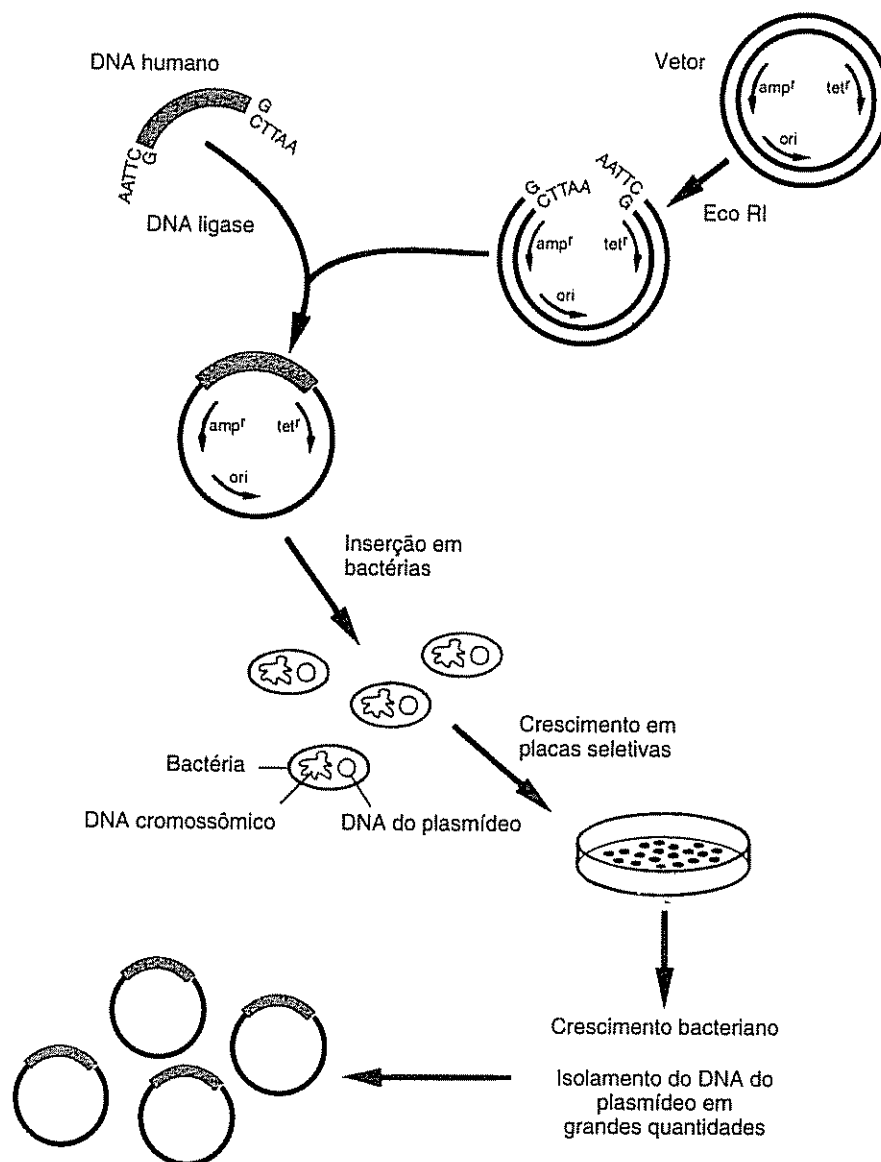



Fig. 4.2 O processo de clonagem de um segmento de DNA humano (entre dois sítios de *Eco*RI) em um vetor de clonagem plasmidial. Aqui, "ori" indica a origem da replicação do DNA para replicação do plasmídeo nas células bacterianas; "ampr" e "tetr" indicam genes bacterianos que conferem resistência à ampicilina e à tetraciclina. O crescimento de bactérias em placas contendo antibióticos seleciona as células que contêm cópias do plasmídeo, com a inserção humana clonada. (Modificada de Fritsch E.F., Wozney J.M. [1994] Methods of molecular genetics. *In* Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A.W., Majerus P.W., Varmus H. [eds.] The Molecular Basis of Blood Diseases, 2.ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia.)

Cosmídeos e Cromossomos Artificiais de Bactérias

Uma desvantagem dos plasmídeos padrão como vetores é que eles são ineficientes para a introdução de moléculas de DNA recombinante nas bactérias se as inserções forem maiores que cerca de 20 kb. Um método para superar esta ineficiência foi o desenvolvimento de vetores cosmídeos. Os cosmídeos são essencialmente plasmídeos que usam a habilidade das partículas infecciosas do bacteriófago lambda para "embalar" eficientemente grandes pedaços lineares de DNA em capas de proteína que então se ligam à superfície das bactérias e injetam seus conteúdos de DNA. A limitação do tamanho de inserção do cosmídeo é que lambda não é capaz de acomodar seu DNA (ou um cosmídeo), haja ou não uma inserção, se o cromossomo do bacteriófago exceder a aproximadamente 50 kb de tamanho. Após a infecção da bactéria de um modo similar ao do vírus lambda, o cosmídeo recirculariza-se e replica-se como um grande plasmídeo. Os fragmentos de DNA exógeno com duas vezes o tamanho das inserções de fago lambda podem ser clonados em vetores cosmídeos.

No final da década de 1990, tornou-se disponível a tecnologia para clonar, em bactérias, fragmentos de DNA muito maiores que os cosmídeos. Tais plasmídeos enormes são chamados de cromossomos artificiais de bactérias (BACs). Os BACs podem levar inserções de DNA humano de 100 a 300 kb de tamanho.

O uso de vetores cosmídeo ou BAC para clonagem é essencialmente o mesmo que o mostrado para os plasmídeos na Fig. 4.2. A diferença entre plasmídeos, cosmídeos e BACs é como os vetores portadores destas grandes inserções são introduzidos nas bactérias.

QUADRO 4–1

Exemplos de Enzimas de Restrição e suas Seqüências de Reconhecimento

Enzimas de Restrição	Fonte	Seqüências de Reconhecimento*
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	5'– G ^ GATC C–3' 3'– C CTAG ^ G–5'
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY 13	G ^ AATT C C TTAA ^ G
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	GG ^ CC CC ^ GG
*Hind*III	*Haemophilus influenzae* R_d	A ^ AGCT T T TCGA ^ A
*Not*I	*Nocardia otitidis-cavarium*	GC ^ GGCC GC CG CCGG ^ CG
Sau 3A	*Staphylococcus aureus* 3A	^ GATC CTAG ^
*Sst*II	*Streptomyces stanford*	CC GC ^ GG GG ^ CG CC

* Todas as seqüências de reconhecimento são dadas na polaridade 5' → 3', como mostrado para *Bam*HI. Os sítios de clivagem em cada filamento são indicados por circunflexos

Cromossomos Artificiais de Levedura

Para muitos dos enfoques de clonagem gênica e mapeamento gênico, ilustrados no Cap. 8, é vantajoso isolar o maior pedaço possível de DNA humano. O vetor de clonagem com a maior capacidade é o cromossomo artificial de levedura (YAC). Dois braços, um contendo um telômero de levedura, um centrômero e um marcador selecionável e outro contendo um telômero e um segundo marcador selecionável, estão ligados às pontas de grandes fragmentos de restrição gerados pela digestão parcial do DNA genômico, criando assim um cromossomo artificial (Fig. 4.4). Estes fragmentos são transferidos para um hospedeiro, *Saccharomyces cerevisiae* (levedura do pão), onde se replicam e se segregam como cromossomos normais lineares de levedura. Os YACs permitem a clonagem e o isolamento de fragmentos de DNA de até 1.000 a 2.000 kb de tamanho, bem menores que um cromossomo humano normal, mas aproximadamente do mesmo tamanho de um cromossomo normal de levedura.

Construção de Bibliotecas

A finalidade da clonagem molecular, logicamente, é isolar um determinado gene ou outra seqüência de DNA em grandes quantidades para posterior estudo. Um enfoque comum para gerar grandes quantidades de uma seqüência é construir um conjunto de clones de bactérias ou leveduras que contenham um vetor no qual os fragmentos de DNA foram inseridos. Tal coleção de clones é chamada de **biblioteca**, a qual, pelo menos teoricamente, contém todas as seqüências encontradas na fonte original, incluindo sua seqüência de interesse. Temos, então, que identificar o clone ou os clones de interesse na biblioteca usando métodos sensíveis de triagem que, em alguns casos, são capazes de encontrar até mesmo uma única cópia do clone de interesse em uma coleção de até 10 milhões de clones iniciais.

Bibliotecas Genômicas

Um enfoque para construir uma biblioteca de DNA genômico é mostrado na Fig. 4.3. O DNA genômico humano é *parcialmente* digerido com uma enzima de restrição como a *Sau*3A de tal modo que alguns dos sítios são cortados e outros, não. Deste modo, se ocorrer a clivagem aleatória de tais sítios, poderá ser obtida uma coleção de fragmentos superpostos de tamanhos adequados para clonagem e ligados aos "braços" do bacteriófago lambda preparados de modo que as pontas *Sau*3A dos fragmentos de DNA humano possam ser ligados ao vetor (ver Fig. 4.3). Após o acondicionamento do cromossomo lambda recombinante em partículas infecciosas de bacteriófago, a biblioteca, contendo 1 milhão ou mais fragmentos do DNA genômico, pode ser estocada para futuro isolamento de muitos genes. Bibliotecas genômicas contendo fragmentos muito maiores de DNA genômico têm sido feitas por meio da produção de YACs contendo DNA parcialmente digerido com, por exemplo, *Eco*RI (ver Fig. 4.4).

Bibliotecas de DNA Complementar

Outro tipo comum de biblioteca usada para isolar genes é a biblioteca de cDNA, a qual representa cópias de **DNA complementar** (logo, cDNA) da população de mRNA presente em um determinado tecido. Tais bibliotecas de cDNA em geral são preferíveis às bibliotecas genômicas como uma fonte de genes clonados (1) porque o clone obtido é uma representação direta das

QUADRO 4–2

Exemplos de Vetores Comumente Usados em Clonagem Molecular

Vetor	Hospedeiro	Tipo de Clonagem	Tamanho da Inserção
Plasmídeos	Bactérias, leveduras	Genômica, cDNA	Até ± 15 kb
Bacteriófago lambda	Bactérias	Genômica, cDNA	Até ± 20 kb
Cosmídeos	Bactérias	Genômica	Até ± 45 kb
BACs	Bactérias	Genômica	de 100 a 300 kb
YACs	Leveduras	Genômica	de 100 a 2.000 kb

BAC = cromossomo artificial de bactérias; YAC = cromossomo artificial de leveduras.

Sítios de Bam HI
DNA vetor
"Braço esquerdo" "Braço direito"
Digestão com Bam HI
DNA genômico humano
Digestão parcial com Sau 3A para obter fragmentos de ± 20 kb de tamanho
Fragmentos internos
Remover fragmentos internos não essenciais à replicação do fago
"Braço esquerdo" "Braço direito"
DNA ligase
"Braço esquerdo" Inserção de ± 20 kb "Braço direito"
"Embalar" em bacteriófago e infectar E. coli
Biblioteca de fragmentos de DNA humano
1 3 5 7
2 4 6 8
etc

Fig. 4.3 Construção de uma "biblioteca" de DNA do genoma humano em um bacteriófago vetor. Cada uma das partículas de fago recombinante na parte inferior contém um fragmento diferente do DNA humano. Uma coleção de vários milhares de tais fagos representaria todo o DNA do genoma humano

seqüências codificantes, sem íntrons ou outras seqüências não-codificantes encontradas no DNA genômico, e (2) porque o uso de uma determinada fonte de mRNA em geral enriquece substancialmente as seqüências derivadas de um determinado gene conhecido como expresso seletivamente neste tecido. Por exemplo, o gene de β-globina é representado em apenas uma parte por milhão em uma biblioteca genômica humana, mas é o principal mRNA transcrito nas hemácias. Assim, uma biblioteca de cDNA preparada de hemácias representa uma excelente fonte de clonagem para isolar cDNAs do gene de β-globina. Similarmente, uma biblioteca de cDNA de fígado ou músculo é uma boa fonte de clones para genes conhecidos como expressos preferencial ou exclusivamente nestes tecidos. Um cDNA, entretanto, contém apenas os éxons de um gene, mas não os íntrons ou seqüências promotoras. Além disso, um cDNA não fornece nenhuma indicação do tamanho ou do número de éxons ou a seqüência dos pontos de corte em 5' e 3'.

Vários métodos foram desenvolvidos para clonar cDNAs, todos eles baseados na enzima **transcriptase reversa**, uma DNA polimerase dependente de RNA derivada de retrovírus que pode sintetizar um filamento de cDNA a partir de um molde de RNA (Fig. 4.5). A transcriptase reversa necessita de um *primer* para iniciar a síntese de DNA. Em geral, é usado um oligonucleotídeo contendo timinas (oligo-dT). Este curto homopolímero liga-se à cauda poliA na ponta 3' das moléculas de mRNA (ver Cap. 3) e assim inicia a síntese de uma cópia complementar. Este cDNA unifilamentar é então convertido em uma molécula bifilamentar por um dos vários métodos disponíveis, e o cDNA bifilamentar pode então ser ligado a um vetor adequado, em geral um plasmídeo ou um bacteriófago, para

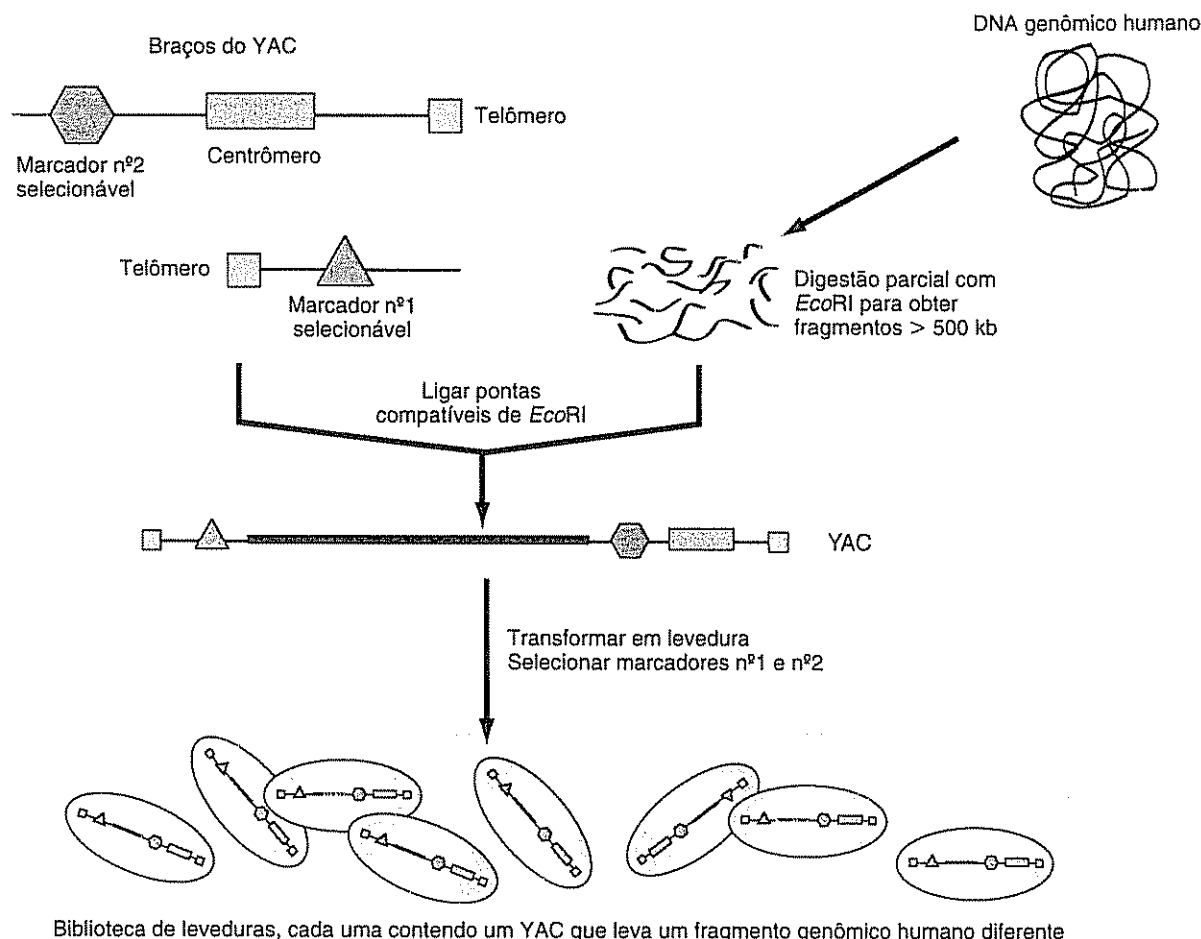



Fig. 4.4 Construção de uma biblioteca genômica em cromossomos artificiais de levedura (YACs) Grandes fragmentos (> 500 kb) de DNA humano são gerados por digestão parcial com *Eco*RI do DNA genômico humano Cada braço do vetor contém um telômero em uma ponta e uma *Eco*RI compatível na outra ponta Cada um também tem um marcador selecionável diferente. e um braço contém ainda um centrômero Os braços do vetor são ligados aos fragmentos de DNA humano para gerar um cromossomo linear artificial com telômeros de levedura e marcadores selecionáveis em cada ponta e um centrômero de levedura em uma ponta Os YACs são transferidos para a levedura. e os marcadores selecionáveis são usados para selecionar apenas as leveduras que contêm o YAC apropriadamente construído

criar uma biblioteca de cDNA que represente todos os mRNA originalmente transcritos encontrados no tipo de célula ou tecido inicial (ver Fig. 4.5). Alguns vetores inteligentemente construídos, chamados de **vetores de expressão**, contêm sinais de transcrição e tradução adjacentes ao sítio de inserção do cDNA, para facilitar a expressão da proteína codificada pelo cDNA clonado em *E. coli* ou em levedura.

Bibliotecas representativas de cDNA de muitos tecidos diferentes ou de épocas diferentes do desenvolvimento são fontes valiosas para a clonagem gênica. Hoje, centenas de tais bibliotecas estão amplamente disponíveis e são a fonte de clones usados em seqüenciamento para gerar enormes bancos de dados de **seqüências marcadas expressas** como parte do Projeto do Genoma Humano (ver Cap. 8).

Sondas de Ácidos Nucleicos

Uma vez feita uma biblioteca, a etapa seguinte é identificar o clone portador da seqüência de interesse dentre os milhões de outros clones portadores de outros fragmentos. A identificação do clone portador de uma inserção de interesse é chamada de **triagem de biblioteca**. A triagem de uma biblioteca em geral é feita com uma técnica muito usada em genética molecular, conhecida como **hibridização de ácidos nucleicos**. Em uma reação de hibridização, ácidos nucleicos unifilamentares são misturados sob condições de temperatura e concentração de sal que permitem apenas o pareamento correto de bases (A com T, G com C) entre os filamentos de DNA. Apenas os filamentos de pares de bases que são corretos podem formar um ácido nucleico *bifilamentar* estável. Não serão formadas moléculas bifilamentares estáveis entre seqüências não-complementares na mistura (Fig. 4.6).

A especificidade da hibridização de ácidos nucleicos para filamentos complementares possibilita o uso de **sondas** de ácidos nucleicos. Uma seqüência (o "alvo") em uma mistura de ácidos nucleicos é testada quanto à sua complementariedade a um fragmento de DNA ou RNA de seqüência conhecida (a "sonda"), que foi marcada com um traçador radioativo, um composto bioquímico ou um corante fluorescente para permitir que a sonda seja subseqüentemente detectada. Por exemplo, um modo comum de marcar uma sonda é com o fósforo 32 (^{32}P), cuja alta energia é exposta em um filme de raios X. Podemos introduzir ^{32}P em uma sonda por uma variedade de métodos que adicionam o ^{32}P à estrutura fosfodiéster de um filamento de DNA. Se a sonda for

complementar ao alvo, ela formará uma molécula bifilamentar estável. A seqüência-alvo no DNA original ou amostra de RNA agora é identificada pela marcação na sonda, facilitando, assim, sua subseqüente detecção e análise ou isolamento.

As sondas podem ser clonadas genomicamente ou as moléculas de cDNA podem ser obtidas pelo uso da tecnologia do DNA recombinante, fragmentos de DNA gerados por PCR (ver discussão mais adiante) ou moléculas de ácido nucleico sintéticas (em geral DNA). As sondas derivadas de DNA clonado ou geradas por PCR em geral são de várias centenas a vários milhares de nucleotídeos de tamanho. Também podemos usar como sondas quimicamente sintetizadas moléculas unifilamentares de DNA, tipicamente com 15 a 60 nucleotídeos de tamanho, conhecidas como **sondas oligonucleotídicas** ou, apenas, **oligonucleotídeos**.

A hibridização dos ácidos nucleicos é um conceito fundamental em biologia molecular. A técnica é usada não só para a triagem de bibliotecas de DNA clonado, mas também, de modo mais geral, para a análise de DNA ou RNA nas células e tecidos, como descrito na próxima seção deste capítulo.

MÉTODOS DE ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS

A análise de RNA ou DNA, ou de ambos, requer a detecção de uma determinada seqüência de DNA ou RNA dentre todas as outras muitas seqüências presentes em uma amostra de células ou tecidos. Ao analisar o DNA genômico, o problema é encontrar e examinar o fragmento específico de DNA de interesse em uma mistura complexa de DNA genômico que contém vários milhões de fragmentos de DNA. Por exemplo, podemos usar uma sonda para o gene de β-globina para examinar uma amostra do DNA de um paciente pela análise de Southern (ver mais adiante) quanto a uma mutação específica tida como responsável pela anemia falciforme. Com amostras de RNA, o problema é detectar e medir a quantidade e a qualidade de um determinado mRNA em uma amostra de RNA de um tecido no qual o mRNA desejado possa constribuir com apenas 1/1.000 ou menos do total de RNA transcrito. Por exemplo, podemos querer usar uma sonda para o gene da distrofina ligado ao X para fazer uma análise Northern (ver mais adiante) de uma amostra de RNA de músculo obtida de um paciente portador de distrofia muscular Duchenne ligada ao X para mRNA transcritos de distrofina. A solução para este problema de detectar uma seqüência rara dentre muitas envolve o uso de eletroforese em gel para separar as moléculas de DNA ou RNA pelo tamanho e então fazer a hibridização de ácidos nucleicos com uma sonda para identificar a molécula de interesse.

Transferência de Southern

A técnica da transferência de Southern, desenvolvida em meados da década de 1970, é o método padrão para a análise da estrutura do DNA cortado por enzimas de restrição. Neste procedimento, diagramado na Fig. 4.7 para uma amostra de DNA genômico, o DNA primeiro é isolado de uma fonte acessível. Qualquer célula do corpo pode ser usada como fonte de DNA, exceto as hemácias maduras, que não têm núcleo. Para a análise de amostras do DNA de um paciente, preparamos o DNA genômico de linfócitos obtidos por venopunção rotineira. Uma amostra de 10 ml de sangue periférico contém cerca de 10^8 leucócitos e fornece mais de 100 μg de DNA, o que é suficiente para dezenas de digestões com enzimas de restrição. O DNA genômico também pode ser preparado de outros tecidos, incluindo culturas de fibroblastos, líquido amniótico ou células de vilosidade coriônica para diagnóstico pré-natal (ver Cap. 18), bem como qualquer amostra de biópsia de órgão (p. ex., fíga-

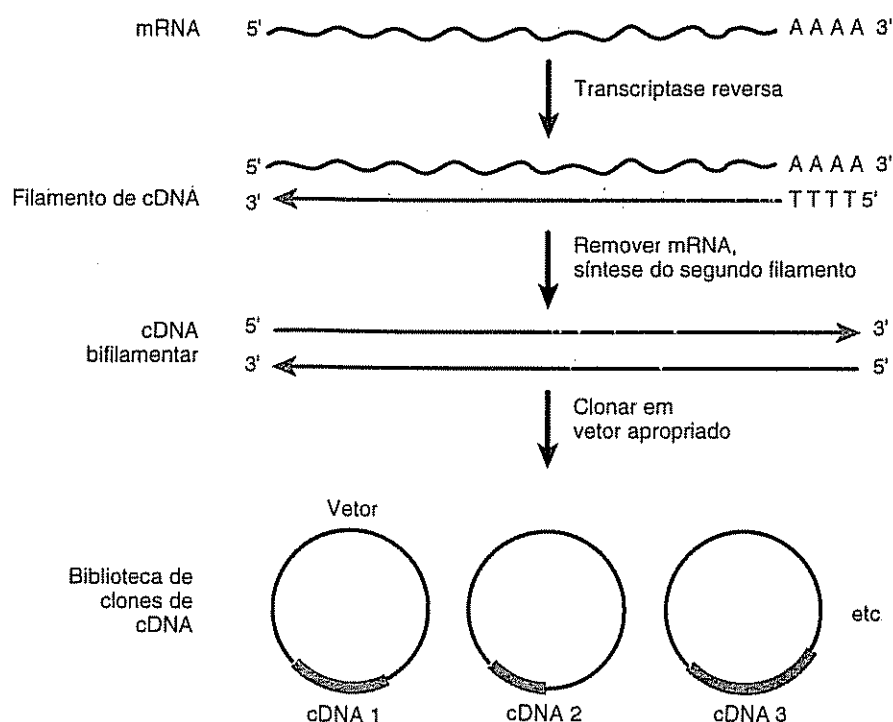



Fig. 4.5 Construção de uma biblioteca de cDNA em um plasmídeo vetor. O RNA de um determinado tecido é copiado no DNA pela enzima transcriptase reversa. Após a síntese do segundo filamento complementar, o cDNA bifilamentar é então clonado.

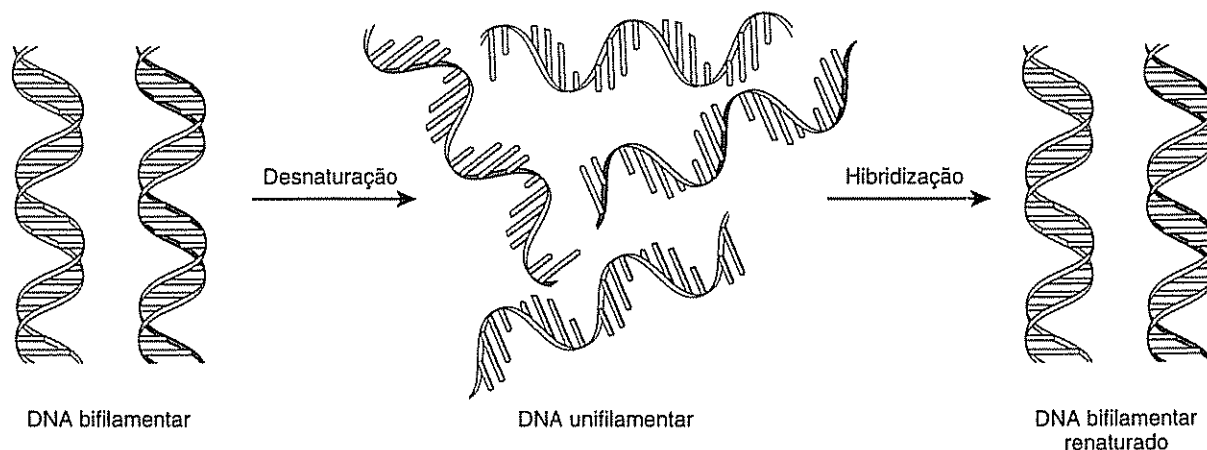



Fig. 4.6 O princípio da hibridização dos ácidos nucleicos. Os dois filamentos complementares de uma dupla hélice de Watson-Crick podem ser "desnaturados" por uma variedade de tratamentos (tais como alta temperatura, pH alto ou condições de pouco sal) para produzir uma coleção de moléculas unifilamentares de DNA. Sob condições que favorecem a formação de DNA bifilamentar renaturado, os filamentos complementares irão se "hibridizar" uns com os outros, mas não com outros filamentos de DNA que tenham uma seqüência de nucleotídeos diferente.

do, rins, placenta). Os fragmentos distintos de DNA, cerca de 1 milhão, gerados por clivagem com enzimas de restrição de uma amostra de DNA genômico são separados, com base no tamanho, por eletroforese em gel de agarose, na qual os fragmentos pequenos movem-se mais depressa em um campo elétrico do que os maiores. Quando o DNA digerido separado deste modo é corado com um DNA fluorescente, tal como o brometo de etídio, os fragmentos de DNA genômico surgem como um esfregaço de material fluorescente, porque em geral existem muitos fragmentos de DNA para que algum se destaque dos outros (Fig. 4.8, *esquerda*). A técnica da transferência de Southern nos permite encontrar e examinar, em um nível grosseiro, um ou dois fragmentos de interesse nesta aparente coleção não-informativa de um milhão ou mais de fragmentos de restrição. Os fragmentos bifilamentares de DNA são primeiro desnaturados com uma base forte para separar os dois filamentos complementares de DNA (ver Fig. 4.6). As moléculas de DNA, agora unifilamentares, são então transferidas do gel para um filtro de nitrocelulose ou náilon por capilaridade (donde o nome "transferência de Southern").

Para identificar um ou mais fragmentos de interesse dentre os milhões de fragmentos no filtro, é usada uma sonda específica marcada. Como descrito antes, a sonda em geral é um trecho de DNA clonado que foi marcado radioativamente e desnaturado para se tornar unifilamentar. A sonda marcada e o filtro são incubados juntos em uma solução sob condições que favorecem a formação de moléculas bifilamentares de DNA (como na Fig. 4.6). Devido à extrema especificidade do pareamento de bases do DNA, a sonda se helicoidiza e forma pontes de hidrogênio estáveis apenas com seu filamento complementar no filtro, e não com todos os outros fragmentos de DNA. Se a sonda for um trecho de DNA genômico clonado, ela em geral se hibridizará a apenas um ou dois fragmentos no filtro, dependendo de como o gene (ou genes) na amostra original de DNA foi cortado pela enzima de restrição específica usada. Se a sonda for um cDNA clonado, entretanto, muitos fragmentos podem se hibridizar, pois o DNA genômico em geral não é colinear ao mRNA transcrito do gene devido à presença de íntrons (ver Cap. 3). Após ter sido lavado para remover a sonda não-ligada, o filtro (com sua sonda radioativa ligada) é exposto a um filme de raios X para revelar a posição de um ou mais fragmentos aos quais a sonda se hibridizou. Assim, como mostra a Fig. 4.8 (*direita*), bandas radioativas específicas são detectáveis no filme de raios X para cada coluna de DNA humano no gel de agarose original. Nesta amostra, a técnica de transferência de Southern mostra que o gene para o receptor de andrógeno ligado ao X, que é responsável pelas características sexuais secundárias masculinas (ver Cap. 10), está ausente na amostra de DNA genômico de um paciente com síndrome de insensibilidade androgênica ligada ao X (também conhecida como feminização testicular). A transferência de Southern permanece o procedimento padrão para o diagnóstico de muitas doenças genéticas nos laboratórios de diagnóstico molecular ao redor do mundo, mas tem sido freqüentemente substituída por métodos baseados em PCR.

Análise com Sondas Oligonucleotídicas Alelo-Específicas

Quando uma determinada mutação é conhecida em pelo menos alguns casos de uma doença genética, podemos refinar a análise de mutações para investigar se esta mutação está presente ou ausente em uma amostra de DNA de um determinado paciente. A melhor sonda a usar para a detecção de uma determinada mutação de uma só base é um oligonucleotídeo sintético, porque seu tamanho curto o torna mais sensível até mesmo a um só pareamento errado entre a sonda e a amostra a ser analisada. Assim, uma sonda oligonucleotídica sintetizada para complementar exatamente a seqüência normal de DNA de um gene (um **oligonucleotídeo alelo-específico**, ou **ASO**) só se hibridiza com a seqüência complementar normal, mas não com uma seqüência complementar imperfeita, na qual há um ou mais pareamentos errados entre o alvo e a sonda (Fig. 4.9). De modo similar, uma ASO feita para a seqüência correspondente a um gene mutante só se hibridiza com a seqüência complementar, mas não com a seqüência em um gene normal.

É importante reconhecer a distinção entre a análise ASO e a análise convencional de Southern com sondas de DNA clonado. No caso das sondas de DNA clonado, a análise em geral

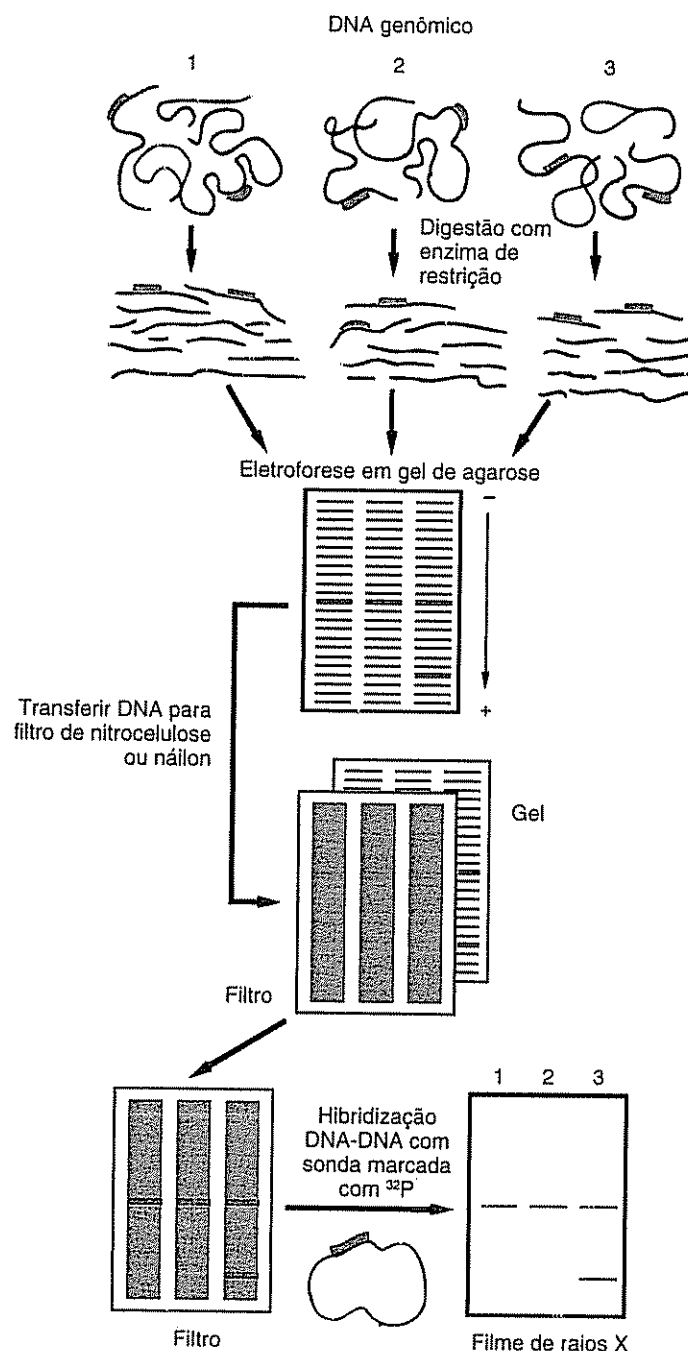



Fig. 4.7 O procedimento da transferência de Southern para a análise de seqüências específicas de DNA em uma mistura complexa de seqüências diferentes, tais como o DNA genômico. Neste exemplo, a amostra 3 tem um padrão diferente de enzima de restrição para a seqüência de DNA detectada pela sonda. Esta variação pode ser decorrente de um polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição (ver Cap. 6) ou a de uma deleção do DNA perto da seqüência detectada.

não revela uma única alteração de base, a menos que, por acaso, a única mudança de base crie ou destrua um sítio de enzima de restrição próximo à região de complementariedade da sonda, alterando assim o tamanho do fragmento detectado pela sonda. Na grande maioria dos casos, os genes mutantes devidos a mudanças de uma só base ou a pequenas mudanças no DNA (pequenas deleções ou inserções, por exemplo) são indistinguíveis dos genes normais por análise de Southern feita usando sondas de DNA clonado padrão. Apenas as sondas ASO pequenas têm a habilidade de detectar de modo confiável as alterações de um nucleotídeo.

A análise de ASO permite a exata identificação de uma seqüência de DNA em particular e pode distinguir as pessoas que portam a seqüência normal de DNA em ambos os cromossomos, a seqüência mutante em ambos os cromossomos ou as pessoas com a seqüência normal em um cromossomo e a seqüência mutante no outro (ver Fig. 4.9). Entretanto, devemos tomar cuidado ao interpretar os resultados da análise de ASO, pois nem todos os genes mutantes em um determinado locus compartilham exatamente a mesma alteração de seqüência do DNA. Assim, a falta de hibridização ao gene mutante ASO não significa necessariamente que o gene do paciente seja normal em toda a sua

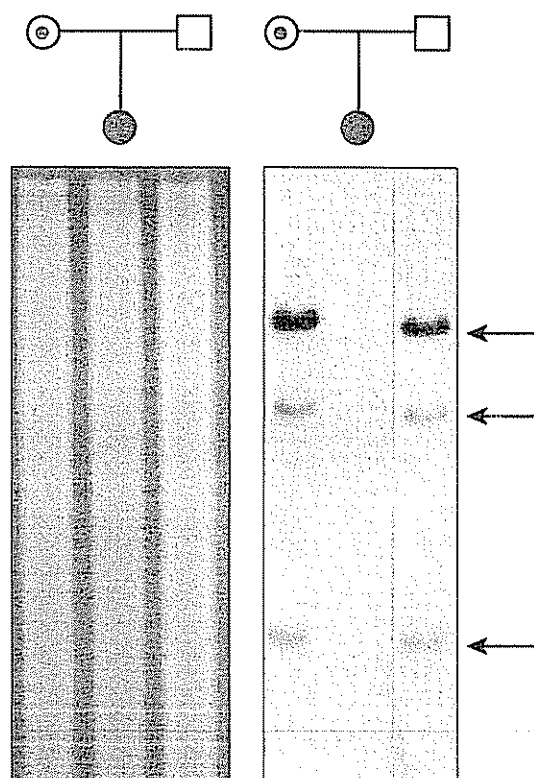



Fig. 4.8 Detecção de uma deleção gênica pela transferência de Southern Quando o DNA genômico dos membros de uma família é digerido com uma enzima de restrição e o DNA é corado com um corante fluorescente de DNA (tal como o brometo de etídio) após eletroforese. todas as amostras parecem iguais (*esquerda*). Após a transferência de Southern e a hibridização a uma sonda de cDNA para o gene humano ligado ao X de receptor de andrógeno. pode-se ver que a pessoa com a síndrome de insensibilidade androgênica tem a deleção deste gene (*direita. coluna do meio*) O indivíduo com insensibilidade androgênica tem o cariótipo 46.XY, mas é fenotipicamente feminino (Figura por cortesia de R Lafreniere. Stanford University)

seqüência. Pode haver uma mutação em outra parte do gene, em outra localização que não a examinada por um determinado ASO. A análise de ASO é usada principalmente nos casos em que há uma forte probabilidade, baseada em outras linhas de evidência, de que uma família ou um indivíduo esteja em risco de uma mutação específica conhecida. O uso da análise de ASO é, portanto, restrita a situações nas quais uma determinada mutação em uma família é conhecida ou para distúrbios genéticos que são caracterizados por um número finito de mutações diferentes. Os exemplos específicos de tais doenças serão considerados nos Caps. 5, 11 e 12.

Transferência Northern

A contraparte da técnica de Southern para a análise de amostras de RNA é chamada de "Northern" ou *blotting* (borrão) de RNA. A transferência Northern é o enfoque padrão para determinar o tamanho e a abundância do mRNA de um gene específico em uma amostra de RNA. O RNA não pode ser cortado pelas enzimas de restrição usadas para a análise de DNA. Os diferentes RNAs transcritos são de tamanhos diferentes, entretanto, dependendo do tamanho e do número de éxons dentro do gene transcrito (ver Cap. 3). Assim, um RNA celular total (ou mRNA purificado) obtido de um determinado tipo de célula é separado de acordo com o tamanho pela eletroforese em gel de agarose e transferido para filtros de nitrocelulose ou náilon. Como no procedimento da transferência de Southern, o filtro é então incubado com uma sonda marcada desnaturada, que se hibridiza a um ou mais RNA transcritos. Após a exposição do filtro lavado a um filme de raios X, uma ou mais bandas podem surgir, revelando a posição e a abundância dos transcritos específicos de interesse.

A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A **reação em cadeia da polimerase (PCR)** é uma alternativa à clonagem para gerar essencialmente quantidades ilimitadas de uma seqüência de interesse (ver Fig. 4.1). A PCR pode amplificar seletivamente uma única molécula de DNA ou RNA vários bilhões de vezes em algumas horas e revolucionou tanto o diagnóstico molecular quanto a análise das doenças genéticas. A PCR é uma amplificação enzimática de um fragmento de DNA (o alvo) situada entre dois "*primers*" oligonucleotídicos. Estes *primers* são criados de modo a que um deles seja complementar a um filamento da molécula de DNA de um lado da seqüência-alvo e o outro seja complementar ao outro filamento da molécula de DNA no lado oposto da seqüência-alvo. Como a ponta 3' de cada *primer* oligonucleotídico (ver Fig. 3.2) segue para a seqüência-alvo a ser amplificada e os *primers* são flanqueadores da seqüência-alvo, os *primers* são amplificados pela síntese, pela DNA polimerase, da seqüência entre eles. Como esquematicamente diagramado na Fig. 4.10, os *primers* são orientados de modo que iniciem dois novos filamentos de DNA que sejam complementares e formem essencialmente uma segunda cópia da seqüên-

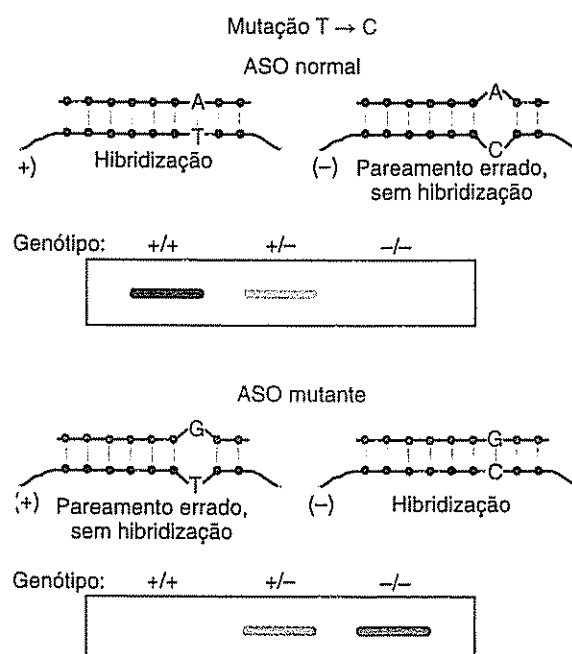



Fig. 4.9 Detecção de mutações de um só par de bases usando sondas oligonucleotídicas alelo-específicas A sonda "normal" fará pareamento de bases apenas com as seqüências de DNA que forem idênticas à sonda (*em cima*) A sonda "mutante" só irá parear com as seqüências de DNA que difiram da seqüência "normal" por uma mutação específica de um par de bases (*embaixo*) As pessoas com todos os três genótipos podem ser diferenciadas por este método

cia-alvo original. Ciclos repetidos de desnaturação por aquecimento, hibridização aos *primers* e síntese enzimática de DNA resultam em uma amplificação exponencial (2, 4, 8, 16, 32,... cópias) da seqüência-alvo de DNA (ver Fig. 4.10). Com o uso de "máquinas de PCR" especificamente criadas, uma rodada de amplificação leva apenas alguns minutos. Em apenas algumas horas, muitos bilhões de cópias podem ser criadas a partir de uma seqüência inicial.

A amplificação rápida de seqüências específicas por PCR pode ser usada para facilitar a clonagem de genes específicos a partir de amostras de DNA para a análise de mutação (ver Fig. 4.1). Trechos particulares de um gene (em geral éxons) de um DNA podem ser rapidamente amplificados usando-se *primers* específicos para o gene normal. O gene mutante pode então ser ou facilmente seqüenciado (ver discussão posterior) ou testado pelos métodos de hibridização ASO. O que era um procedimento muito trabalhoso, envolvendo a construção de uma biblioteca genômica ou de cDNA a partir do DNA ou do RNA dos pacientes, seguido da triagem do gene de interesse, agora pode ser feito em menos de um dia. A PCR facilitou muito o desenvolvimento e a aplicação clínica de muitos testes diagnósticos de DNA.

A PCR também pode ser aplicada à análise de pequenas amostras de RNA, um procedimento em geral chamado de PCR de transcriptase reversa. Um único filamento de cDNA é primeiro sintetizado a partir do mRNA de interesse com a mesma transcriptase reversa que é usada para preparar bibliotecas clone de cDNA (ver Fig. 4.5). Os *primers* de PCR são então adicionados, juntamente com a DNA polimerase, como no caso da PCR de

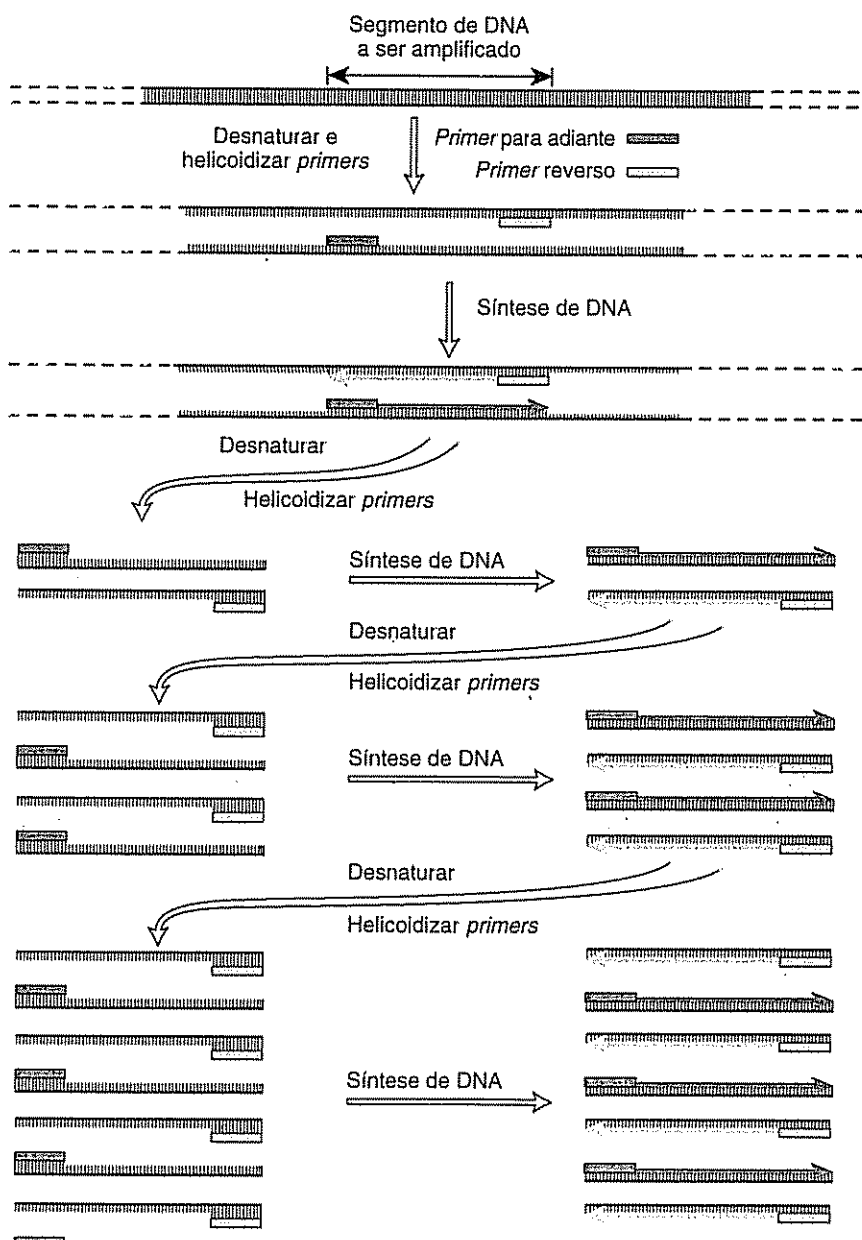



Fig. 4.10 A reação em cadeia da polimerase. Pela síntese repetida de uma região do DNA situada entre dois *primers* de DNA, esta região do DNA é específica e seletivamente amplificada de modo exponencial. Três rodadas sucessivas de amplificação são mostradas, resultando em um total de oito cópias da seqüência-alvo. Após 30 rodadas de amplificação, são criadas mais de um bilhão de cópias da seqüência.

DNA. Um dos oligonucleotídeos inicia a síntese do segundo filamento do cDNA, que em sua forma bifilamentar serve como alvo para a amplificação pela PCR.

A PCR é uma técnica extremamente sensível. Ela permite a detecção e a análise de seqüências gênicas específicas em uma amostra do paciente sem clonagem e sem a necessidade de transferência de Southern ou Northern. As análises podem ser feitas até mesmo em uma única célula obtida de um fio de cabelo, das poucas células bucais presentes em um bochecho, de um único blastômero removido de um embrião no estágio de quatro células, de espermatozóides colhidos de uma amostra vaginal de uma vítima de estupro ou de uma gota de sangue seco da cena de um crime. A PCR elimina, portanto, a necessidade de preparar grandes quantidades de DNA ou RNA das amostras de tecido.

A PCR rapidamente está se tornando um método padrão para a análise de amostras de DNA e RNA nos laboratórios de pesquisa, nos laboratórios de diagnóstico clínico molecular e nos laboratórios forenses e de medicina legal. A PCR é mais rápida, menos dispendiosa, mais sensível e usa menos amostras do paciente que qualquer outro método de análise de ácidos nucleicos. Exemplos específicos de seu uso para a detecção de mutações nos distúrbios genéticos são apresentados no Cap. 19.

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM CROMOSSOMOS

Do mesmo modo que as sondas de ácidos nucleicos podem ser hibridizadas com amostras de DNA digerido por enzimas de restrição ou RNA purificado imobilizado em filtros para análise de Southern e Northern, as sondas também podem ser hibridizadas ao DNA contido dentro de cromossomos imobilizados em lâminas de microscopia (ver Cap. 3). Esta técnica é chamada de **hibridização *in situ*** porque o DNA nos cromossomos metafásicos fixados em lâminas é desnaturado no local (donde o "*in situ*") para expor os dois filamentos do DNA, permitindo assim que uma sonda marcada se hibridize ao DNA cromossômico. O método mais comum de marcar sondas para a hibridização *in situ* nos cromossomos é com um corante fluorescente. A sonda hibridizada fluoresce quando os cromossomos são vistos com um comprimento de onda que excita o corante fluorescente. A localização do sinal de hibridização e, portanto, a localização do segmento de DNA ao qual a sonda se hibridiza é então determinada ao microscópio (ver Figs. 8.8 e 9.4). Esta técnica, conhecida como **hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)**, é amplamente usada em citogenética clínica diagnóstica (Ver Caps. 9 e 10), bem como em mapeamento gênico (ver Cap. 8).

A Análise Molecular de uma Mutação Humana

Como se faz para identificar uma mutação em um gene de um paciente com um distúrbio genético que se sabe ou suspeita que seja decorrente de defeitos neste gene? Por exemplo, considere um paciente com um diagnóstico de β-talassemia, um defeito recessivo autossômico no gene de β-globina (ver Cap. 11). O diagnóstico inicial em geral é feito apenas com base em achados clínicos e hematológicos. É importante examinar o próprio gene, primeiro para confirmar o diagnóstico clínico e, segundo, para determinar a mutação específica no locus de β-globina tanto para uso futuro no teste de portador quanto para um possível diagnóstico pré-natal na família do paciente. Além disso, a identificação da mutação aumenta nossa compreensão da relação entre mutações específicas em um gene e a fisiopatologia resultante.

Vários testes podem ser inicialmente usados para examinar a integridade do próprio gene de β-globina e seu mRNA. Ambas as cópias do gene estão presentes no paciente e sua estrutura está normal? Ou uma ou ambas as cópias do gene estão deletadas, como foi descrito em alguns casos de β-talassemia? A transferência de Southern do gene de β-globina pode abordar a questão de se o gene está presente e se sua estrutura está normal. Por este método, podemos detectar grandes defeitos moleculares (p. ex., deleções, rearranjos) que estão bem abaixo do nível de sensibilidade da análise cromossômica. A transferência de Southern não pode revelar a presença da maioria das mutações únicas, contudo, tais como mudanças de um par de bases ou deleções muito pequenas de apenas um par de bases, a menos que elas perturbem o sítio da endonuclease de restrição.

Se o gene está presente, ele é transcrito? Para determinar se um transcrito específico está presente, é usada a **transferência Northern**. Este enfoque também nos possibilita detectar grandes mudanças nos níveis de mRNA ou na estrutura de um gene específico, mas não permite detectar pequenas alterações (p. ex., uma mutação que mude um códon em um éxon).

Tendo questionado se há grandes mudanças no gene ou em seu mRNA, podemos examinar a estrutura gênica e a expressão em níveis progressivamente mais refinados de análise. Na β-talassemia, como em muitos outros distúrbios genéticos, muitas mutações já conhecidas são responsáveis pela doença. Para determinar se uma das mutações conhecidas é responsável por um determinado caso de β-talassemia, podemos usar **oligonucleotídeos alelo-específicos (ASOs)**, que possibilitam a detecção de mutações específicas de um único par de bases (ver texto principal). Se a análise ASO não revelar uma mutação conhecida, pode ser necessário comparar a seqüência do gene mutante de β-globina (ou cDNA) do paciente com um gene normal de β-globina usando a **reação em cadeia da polimerase (PCR)** para gerar especificamente muitos milhões de cópias de um determinado fragmento gênico e seqüenciá-lo. Deste modo, a mutação específica responsável pelo distúrbio genético no paciente pode ser identificada e usada para desenvolver testes diretos de triagem para esta mutação na família do paciente.

Um tipo comumente usado de sonda para FISH é uma seqüência genômica contígua única, clonada como inserção em um cosmídeo, um BAC ou um vetor YAC que se hibridize no local da seqüência-sonda em um par de cromossomos homólogos. A sonda FISH também pode ser uma mistura complexa de DNA de uma parte de um braço cromossômico, um braço inteiro de um cromossomo ou mesmo um cromossomo inteiro. Dependendo de como a sonda é constituída, uma grande parte de um braço

cromossômico, o braço inteiro ou o cromossomo inteiro irá se corar com a sonda hibridizada fluorescente. Tal mistura de sondas é conhecida como **sondas multicoloridas de cromossomos** (ver Cap. 9 para exemplos).

Duas técnicas recentemente desenvolvidas ampliam ainda mais o poder da tecnologia FISH para a análise dos cromossomos humanos. A primeira destas técnicas, a **hibridização genômica comparativa**, é usada para medir as diferenças no número de cópias ou dosagem de um segmento cromossômico em particular entre duas amostras diferentes de DNA. O DNA total de uma amostra é marcado com um corante fluorescente vermelho e a outra amostra é marcada com um corante verde. As duas amostras de DNA marcado são misturadas em quantidades iguais e usadas como uma sonda multicolorida para FISH com cromossomos metafásicos humanos *normais*. A proporção de fluorescência de vermelho para verde emitida pela sonda ao longo de cada cromossomo é então medida. Se o DNA de uma determinada região de um cromossomo for igualmente representado nas duas amostras que constituem a sonda, a proporção de fluorescência de vermelho para verde no sinal FISH será de 1:1 (Fig. 4.11). Se, entretanto, o DNA marcado com verde for de uma linhagem celular normal e o DNA marcado com vermelho vier de células que têm falta de material (**monossomia**, ver Cap. 9) ou que têm material adicional (**trissomia**, ver Cap. 9) de um cromossomo todo ou de parte de um cromossomo, a proporção de fluorescência de vermelho para verde mudará de 1:1 para menos de 1, no caso de monossomia, ou mais de 1, no caso de trissomia, na região do cromossomo com a dosagem gênica anormal. Por exemplo, como mostra a Fig. 4.11, o DNA marcado com vermelho dos tecidos de uma pessoa com trissomia parcial da ponta do cromossomo 18p resulta em uma proporção de vermelho para verde de 1,5:1 em 18p distal. De modo similar, se a pessoa tiver monossomia 18p, a proporção de fluorescência de vermelho para verde ao longo de 18p será de 0,5:1. A hibridização genômica comparativa é particularmente útil para encontrar mudanças na dosagem gênica em tecidos que podem servir como uma fonte de DNA para fazer uma sonda, mas não podem ser facilmente cariotipadas (ver Cap. 3), tal como tumores sólidos e sarcomas de tecidos moles. A técnica tem sua aplicação mais ampla no estudo das aberrações cromossômicas nas células cancerosas (ver Cap. 16).

Uma segunda técnica FISH poderosa é a **cariotipagem espectral (SKY)**. Um reagente essencial para SKY é ter 24 diferentes sondas multicoloridas de cromossomos, uma para cada um dos 24 cromossomos humanos. Estas sondas específicas de cromossomos são obtidas pela separação de cada cromossomo com base no tamanho e nas características de bandeamento de todos os outros cromossomos usando a distribuição cromossômica ativada por fluorescência. Cada amostra de DNA específica de cromossomo é marcada com uma combinação diferente de corantes fluorescentes, que emitem comprimentos de onda diferentes. Deste modo, cada cromossomo humano é representado por uma sonda com seu próprio espectro característico de comprimentos de onda de fluorescência. Todas as 24 sondas para os cromossomos humanos são então combinadas e usadas para FISH de cromossomos metafásicos (ver Fig. 9.5B, *encarte em cores*). Como cada sonda específica de cromossomo emite seu próprio comprimento de onda de fluorescência, os rearranjos estruturais são facilmente vistos, e os cromossomos envolvidos podem ser identificados com facilidade.

ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DO DNA

O enfoque mais amplamente usado para a análise da seqüência de DNA é o seqüenciamento de Sanger (em homenagem a Fred Sanger, que, com Walter Gilbert, recebeu o Prêmio Nobel em 1980 por desenvolver o seqüenciamento do DNA). Agora, a seqüência de qualquer segmento de DNA purificado pode ser determinada, seja um fragmento clonado seja uma seqüência-alvo amplificada por PCR. O seqüenciamento de Sanger tira proveito de análogos químicos de nucleotídeos para inibir a enzima DNA polimerase à medida que ela sintetiza o filamento complementar ao molde original que está sendo seqüenciado (Fig. 4.13). Para fazer a reação

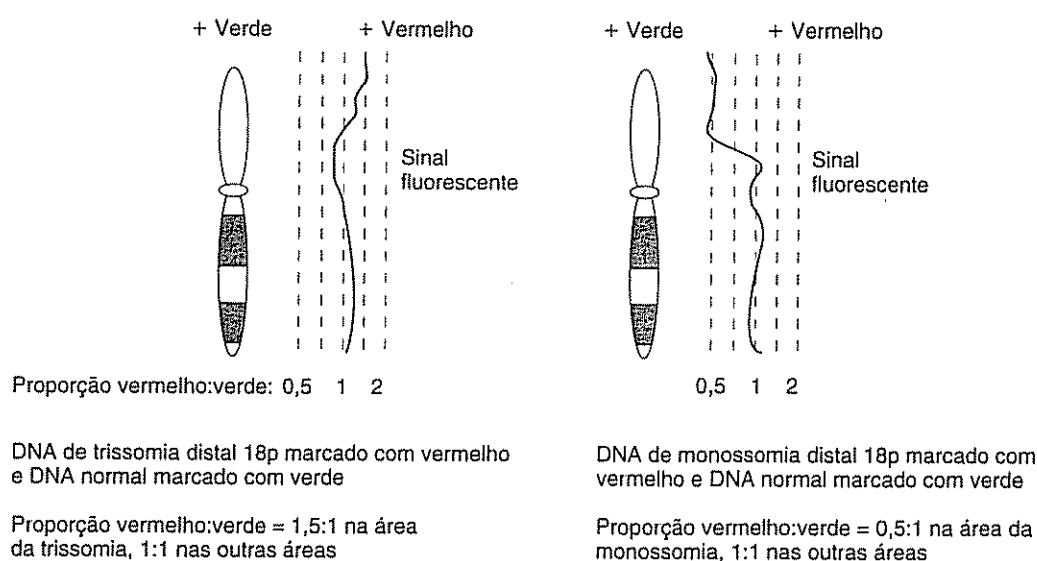



Fig. 4.11 Resultados de hibridização genômica comparativa, tipicamente relatados por um gráfico de intensidade de fluorescência ao longo da extensão de um cromossomo. O DNA de duas fontes diferentes é purificado, cada um é marcado com um corante fluorescente diferente, e as sondas são misturadas e usadas como corantes cromossômicos em metáfases normais. A intensidade de hibridização a cada corante será igual em todas as regiões dos cromossomos metafásicos que estiverem presentes em quantidades iguais nas duas fontes diferentes de DNA. Se um segmento de um cromossomo estiver duplicado ou deletado em uma linhagem celular *versus* a outra, a intensidade relativa de hibridização com o corante não será mais de 1:1.

Fig. 4.12 Cariotipagem espectral (SKY) As 24 sondas multicoloridas de cromossomos individuais são marcadas com corantes fluorescentes diferentes e usadas como corantes cromossômicos do genoma total Os sinais fluorescentes são analisados por um sofisticado *software* de imagem e arquivados em um computador Para gerar a fotografia, o computador atribui uma cor diferente para cada um dos 24 espectros diferentes de fluorescência gerados pelas sondas multicoloridas de cromossomos individuais Nesta metáfase de uma mulher 46,XX, apenas 23 cores estão presentes O espectro único gerado pela sonda multicolorida do cromossomo Y não é visto (Ver Fig 9.5*B*, *encarte em cores*) (Figura por cortesia da Dra Amalia Dutra, National Human Genome Research Institute.)

Fig. 4.13 O método de Sanger para determinação da seqüência nucleotídica de um fragmento de DNA clonado Ver o texto para a descrição

de seqüenciamento, a síntese de DNA é iniciada por um oligonucleotídeo pequeno, e a DNA polimerase continua ao longo da seqüência molde, ampliando o *primer* (iniciador) e incorporando ou nucleotídeos radioativamente marcados ou nucleotídeos com marcadores fluorescentes na nova seqüência sintetizada. Obtemos informações da seqüência adicionando um dos análogos inibidores, juntamente com todos os quatro nucleotídeos normais, em cada uma das quatro reações de seqüenciamento. Assim, na reação para definir a localização das unidades G, um análogo de G é incluído na reação, de modo que a ampliação de uma parte das moléculas individuais irá parar quando a DNA polimerase incorporar o análogo. As quantidades relativas de nucleotídeo G normal e análogo de G nesta reação são ajustadas de modo que a polimerase incorpore o análogo de G em alguns filamentos recém-sintetizados no mesmo momento que incorporaria uma G, enquanto em outros filamentos um análogo de G é incorporado no momento seguinte à incorporação de G, alguns no terceiro, e assim por diante. Quando esta amostra é então analisada por eletroforese em gel, observa-se uma série de bandas de comprimentos correspondentes aos locais de cada unidade G. Reações similares para A, T e C fornecem séries correspondentes de fragmentos. O conjunto de quatro reações pode então ser lido como uma "escada" direcional de seqüenciamento para determinar a seqüência de nucleotídeos do fragmento de DNA que está sendo analisado (ver Fig. 4.13).

Hoje, as máquinas automatizam o procedimento de seqüenciamento de DNA, que é rotineiramente aplicado para a análise tanto de genes normais quanto mutantes. A informação da seqüência de DNA é crucial para prever a seqüência de aminoácidos codificada por um gene recém-isolado, para detectar mutações individuais em doenças genéticas e para criar sondas ASO ou *primers* de PCR usados em procedimentos diagnósticos moleculares. O seqüenciamento automatizado também está sendo

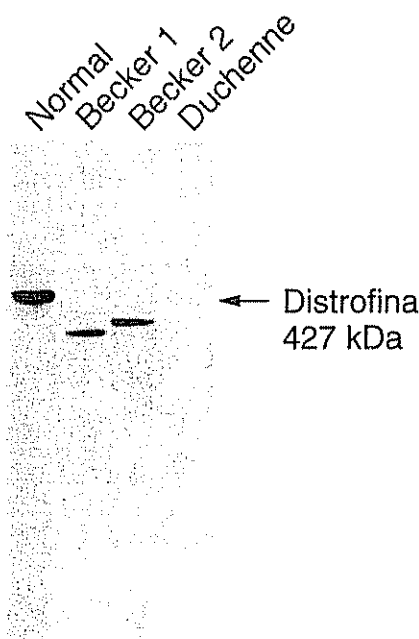



Fig. 4.14 Uma transferência Western demonstrando a presença ou a ausência da proteína muscular distrofina (*seta*) nos extratos de proteína de pacientes com a forma grave Duchenne ou branda Becker de distrofia muscular ligada ao X Ver Cap 12 para maior descrição (Foto original por cortesia de P Wray, Hospital for Sick Children, Toronto.)

muito aplicado no Projeto do Genoma Humano para obter a seqüência de nucleotídeos de todos os três bilhões de bases de todo o genoma humano (ver Cap. 8), bem como para completar a seqüência de outros organismos de importância médica e científica, incluindo a *E. coli*, a levedura *S. cerevisiae*, o verme *Caenorhabditis elegans*, a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, o camundongo e muitos microrganismos patogênicos.

MÉTODOS DE ANÁLISE DE PROTEÍNAS

A análise do funcionamento gênico tanto normal quanto anormal em geral requer um exame da proteína codificada por um gene normal ou mutante de interesse. Na maioria dos casos, deseja-se conhecer não só o defeito molecular no DNA, mas também como este defeito altera a proteína codificada para produzir o fenótipo clínico.

Transferência Western

Logo depois do desenvolvimento das transferências de Southern e Northern para o DNA e o RNA, um procedimento conceitualmente correlato para a detecção de proteínas específicas foi descrito como **transferência Western**. Esta técnica pode ser usada para obter informações sobre o tamanho e a quantidade da proteína mutante nos extratos celulares de pacientes com doenças genéticas. Neste método, as proteínas isoladas de um extrato celular são separadas de acordo com o tamanho por uma eletroforese em gel de poliacrilamida e então transferidas para uma membrana. A membrana contendo as proteínas separadas é então incubada com anticorpos que reconhecem especificamente a proteína a ser analisada. A interação específica entre o anticorpo e seu antígeno pode então ser detectada por um segundo anticorpo contra o primeiro, marcado com uma substância detectável histoquimicamente, por fluorescência ou radioativa. Um exemplo de transferência Western usada para detectar a presença ou ausência e, se presente, o tamanho da proteína muscular distrofina em pacientes com distrofia muscular ligada ao X é mostrado na Fig. 4.14.

Referências Gerais

Davies K (1995) Human Genetic Disease Analysis: A Practical Approach, 2nd ed. IRL Press, Oxford, England.

Dieffenbach C, Dveksler G (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Fritsch EF, Wozney JM (1994) Methods of molecular genetics. *In* Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H (eds) The Molecular Basis of Blood Diseases, 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

Sambrook J, Russell D (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Handyside AH (1998) Clinical evaluation of preimplantation genetic diagnosis. Prenat Diagn 18:1345–1348.

Monaco AP, Larin Z (1994) YACs, BACs, PACs and MACs: Artificial chromosomes as research tools. Trends Biotechnol 12:280–286.

Vnencak-Jones CL (1999) Molecular testing for inherited diseases. Am J Clin Pathol 112 (suppl 1): S19–S32.

Weedn VW (1996) Forensic DNA tests. Clin Lab Med 16:187–196.

Problemas

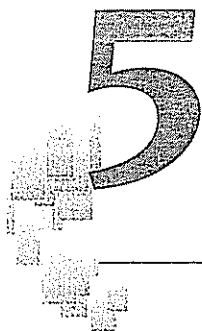
1. Considere as situações diagnósticas que se seguem. Que método (ou métodos) de laboratório seria o mais apropriado?
   (a) Diagnóstico pré-natal de um feto masculino com risco de portar distrofia muscular Duchenne (DMD). Estudos anteriores nesta família já documentaram uma deleção gênica completa.
   (b) Você deseja avaliar a quantidade de mRNA de distrofina presente em uma amostra de músculo de uma portadora obrigatória brandamente afetada por DMD.
   (c) Diagnóstico pré-natal de um feto masculino com risco de portar DMD. Estudos anteriores já documentaram uma determinada mudança de base nucleotídica que é responsável pelo defeito nesta família.
2. Quais são algumas das vantagens ou desvantagens da PCR para o diagnóstico de defeitos genéticos em comparação com a transferência de Southern? Com as dosagens bioquímicas de níveis enzimáticos para diagnóstico de deficiências enzimáticas?
3. De qual dos seguintes tecidos pode ser obtido DNA para procedimentos diagnósticos: amostra de tecidos de biópsia, leucócitos, cultura de células de líquido amniótico, hemácias?
4. Por que a clonagem de um gene é considerada um avanço significativo para o campo da genética médica? O que a disponibilidade de um gene clonado permite fazer que não se podia antes?
5. Você quer clonar um gene que é expresso no fígado e que se suspeita de que esteja envolvido em uma doença genética. Tanto uma biblioteca de DNA genômico humano quanto uma biblioteca de cDNA de fígado estão disponíveis. Qual você escolheria e por quê?
6. Um paciente com uma doença genética tem uma mutação (C para T, sublinhada) no éxon 18 de um gene. A seqüência normal é:

   CTGTGCCGTATGAAAAGACCAATCCGA-
   GAAGTTCCTGTTACCAAACTCATAGAC

   A seqüência no paciente é:

   CTGTGCCGTATGAAAAGACCAATCTGA-
   GAAGTTCCTGTTACCAAACTCATAGAC

   (a) Qual é a conseqüência desta mutação no funcionamento do gene? (Os primeiros três nucleotídeos de cada seqüência constituem um códon do gene.)
   (b) Você precisa desenvolver um ASO para a mutação no DNA genômico. Qual(is) do(s) seguinte(s) oligonucleotídeo(s) seria(m) útil(eis) em um ASO para a seqüência normal? Para a seqüência mutante? Explique seus motivos para selecionar ou rejeitar cada oligonucleotídeo.

      1. 5' GCCGTATGAAAAGACCAATCTG
      2. 5' GACCAATCCGAGAAGTTCC
      3. 5' GACCAATCTGAGAAGTTCC
      4. 5' GGAACTTCTCAGATTGGTC
      5. 5' ATCTGAG

Padrões de Herança Monogênica

No Cap. 1, as três principais categorias de distúrbios genéticos, monogênicos, cromossômicos e complexos, foram citadas e resumidamente caracterizadas. Na primeira seção deste capítulo, os padrões típicos de transmissão dos distúrbios monogênicos serão discutidos em maiores detalhes. A ênfase está nos mecanismos genéticos e moleculares pelos quais as mutações nos genes resultam em padrões de herança recessiva, dominante e ligada ao X. Na seção seguinte, descreveremos como o *imprinting* gênico e o mosaicismo podem alterar ou obscurecer padrões de herança tipicamente monogênicos.

As características monogênicas em geral são chamadas de **mendelianas**, pois, assim como as características das ervilhas estudadas por Gregor Mendel, elas ocorrem em média em proporções fixas entre a prole de tipos específicos de reprodução. Os fenótipos monogênicos conhecidos até agora estão citados na referência clássica de Victor A. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man* (12.ª edição, 1998), que tem sido indispensável aos geneticistas médicos por décadas. A versão *online* do *Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) é continuamente atualizada e está disponível na World Wide Web. OMIM cita mais de 9.300 genes, dos quais mais de 1.400 são loci gênicos estabelecidos nos quais as mutações estão associadas a um distúrbio clinicamente significativo. Assim, dos cerca de 50.000 genes humanos, mais de 3% já foram identificados como genes que contribuem de modo importante para doenças humanas. Estes 3% provavelmente são uma subestimativa. O ritmo de descoberta de novos genes é veloz e parece certo que se acelerará devido aos esforços internacionais dedicados ao mapeamento e ao seqüenciamento de todo o genoma humano e os genes expressos em tecidos humanos diferenciados

Os distúrbios monogênicos são primariamente, mas de modo algum exclusivamente, distúrbios da faixa de idade pediátrica. Menos de 10% manifestam-se após a puberdade e apenas 1% ocorre após o final do período reprodutivo. Embora individualmente raros, como um grupo são responsáveis por uma proporção significativa de doenças e mortes na infância. Em um estudo populacional de mais de 1 milhão de nativivos, a incidência de graves distúrbios monogênicos foi estimada como sendo de 0,36%; entre crianças hospitalizadas, de 6% a 8% são tidas como tendo distúrbios monogênicos.

TERMINOLOGIA

Muito embora os princípios da genética médica sejam relativamente fáceis de entender, a terminologia não-familiar pode tornar o assunto a princípio inacessível. Para auxiliar o problema de linguagem, revisamos alguns termos e introduzimos outros que não foram previamente definidos.

A variação herdada no genoma é a pedra angular da genética humana e médica. Como introduzido no Cap. 2, as variantes alternativas da informação genética em um determinado locus são chamadas de **alelos**. Para muitos genes, há uma única versão que prevalece, presente na maioria das pessoas, que os geneticistas chamam de alelo normal ou **tipo selvagem**. As outras versões do gene são os alelos **mutantes**, que diferem do alelo selvagem por **mutação**, uma mudança permanente na seqüência de nucleotídeos ou disposição do DNA. Se existirem pelo menos dois alelos relativamente comuns do locus na população, o locus é dito como exibindo um **polimorfismo** (literalmente "muitas formas"), como será discutido em detalhes nos capítulos subseqüentes. Além de um alelo normal ou dos alelos polimórficos comuns, os loci também podem ter um ou mais alelos variantes raros. Alguns destes alelos raros foram originalmente identificados porque causam doenças genéticas, enquanto outros não são significativos para a saúde.

O **genótipo** de uma pessoa é o conjunto de alelos que constitui sua composição genética, seja coletivamente em todos os loci ou, mais tipicamente, em um único locus. Em contraste, o **fenótipo** é a expressão observável de um genótipo como uma característica morfológica, clínica, bioquímica ou molecular. É lógico que um fenótipo pode ser normal ou anormal em um determinado indivíduo, mas neste livro, que destaca os distúrbios de significado médico, enfocaremos os fenótipos anormais, isto é, os distúrbios genéticos.

Um **distúrbio monogênico** é aquele determinado pelos alelos em um único locus. Um alelo variante, que surge por mutação em algum momento do passado recente ou remoto e em geral é relativamente raro, substitui um alelo selvagem em um ou em ambos os cromossomos. Quando uma pessoa tem um par de alelos idênticos, ela é dita como sendo **homozigota** (um **homozigoto**). Quando os alelos são diferentes, ela é **heterozigota** (um **heterozigoto**, portador). O termo **heterozigoto composto** é usado para descrever um genótipo no qual estão presentes dois alelos mutantes diferentes do mesmo gene em vez de um normal e um mutante. Estes termos (homozigoto, heterozigoto e heterozigoto composto) podem ser aplicados a pessoas ou a um genótipo. O termo **mutação** é usado em

genética médica com dois sentidos: às vezes, para indicar uma nova mudança genética que antes não era conhecida em uma família e, às vezes, apenas para indicar um alelo causador de doença. Mutação e mutante, entretanto, não são usados para designar seres humanos que tenham alelos mutantes que surgiram por mutação.

Os distúrbios monogênicos são caracterizados por seu padrão de transmissão nas famílias. Para estabelecer o padrão de transmissão, em geral a primeira etapa é obter informações sobre a história familiar do paciente e resumir os detalhes sob a forma de um **heredograma**, uma representação gráfica de uma árvore genealógica, usando símbolos padrão (Fig. 5.1). O membro por meio do qual uma família com um distúrbio genético é inicialmente avaliada é o **probando** (sinônimo de **propósito** ou **caso-índice**), se ele for afetado. A pessoa que leva a família para a avaliação de um consultor de genética é chamada de **consulente**. O consulente pode ser uma pessoa afetada ou um parente não-afetado de um probando. Uma família pode ter mais de um probando, se avaliada por meio de mais de uma fonte. Irmãos e irmãs de uma família formam uma **prole**. A família ampliada, ou seja, considerada como todos os membros nela incluídos, é chamada de **parentesco** (Fig. 5.2). Os parentes são classificados como de **primeiro grau** (pais, irmãos e prole do probando); **segundo grau** (avós e netos, tios e tias, sobrinhos, sobrinhas e meio-irmãos); **terceiro grau** (p. ex., primos em primeiro grau) e assim por diante, dependendo do número de etapas (em outras palavras, o número de meioses) no heredograma entre os dois parentes. A prole de primos em primeiro grau são primos em segundo grau, e um filho é um primo germano de seus primos em primeiro grau. Os casais que têm um ou mais ancestrais em comum são **consangüíneos**. Se só houver um membro afetado em uma família, ele ou ela será um caso **isolado**, ou se o distúrbio for determinado como sendo causado por uma nova mutação no propósito, um caso **esporádico** (ver Fig. 5.2).

DISTÚRBIOS GENÉTICOS COM HERANÇA MENDELIANA CLÁSSICA

Os padrões apresentados pelos distúrbios monogênicos nos heredogramas dependem principalmente de dois fatores: (1) o local cromossômico do locus gênico, que pode ser **autossômico** (situado em um autossomo) ou **ligado ao X** (situado no cromossomo X), e (2) se o fenótipo é **dominante** (expresso quando apenas um cromossomo de um par porta o alelo mutante, a despeito de haver um alelo normal no outro cromossomo do par) ou **recessivo** (expresso apenas quando ambos os cromossomos de um par portam o alelo mutante). Assim, existem quatro padrões básicos de herança monogênica:

	Dominante	Recessivo
Autossômico	Autossômico dominante	Autossômico recessivo
Ligado ao X	Dominante ligado ao X	Recessivo ligado ao X

Fig. 5.1 Símbolos comumente usados nos heredogramas. Embora não exista um sistema uniforme de notação de heredogramas, os símbolos usados aqui estão de acordo com as recentes recomendações feitas por profissionais no campo da informação genética (De Bennett R. L., Steinhaus K. A., Uhrich S. B. *et al.* (1995) Recommendations for standardized pedigree nomenclature. J Genet Counsel 4:267-279.)

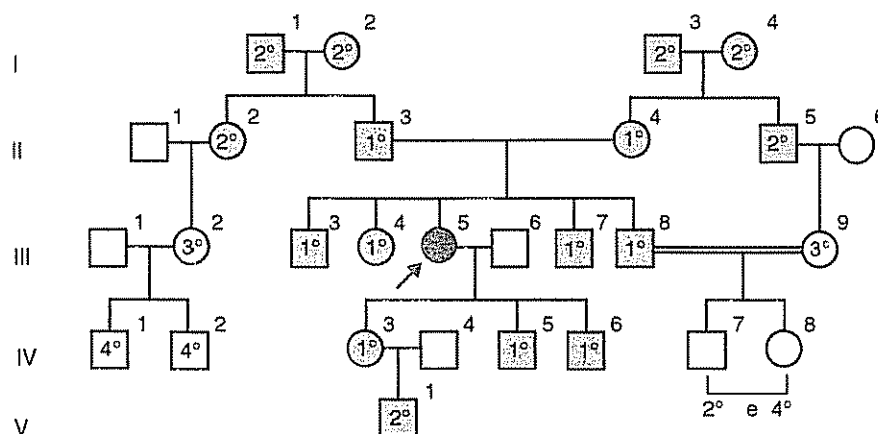



Fig. 5.2 Parentesco em um heredograma. A seta indica a **probanda**, III-5, que representa um **caso isolado** de um distúrbio genético. Ela tem quatro **irmãos**, III-3, III-4, III-7 e III-8. Seu parceiro/marido é III-6, e eles têm três filhos (sua prole **F1**). A probanda tem nove parentes em **primeiro grau** (seus pais, irmãos e prole), nove parentes em **segundo grau** (avós, tios/tias, sobrinhos/sobrinhas, netos), dois parentes de **terceiro grau** (primos em primeiro grau) e quatro parentes em **quarto grau** (primos germanos). IV-3, IV-5 e IV-6 são **primos em segundo grau** de IV-1 e IV-2. IV-7 e IV-8, cujos genitores são **consangüíneos**, são duplamente aparentados à probanda: parentes em segundo grau por seu pai e em quarto grau por sua mãe.

Herança Autossômica e Ligada ao X

A distinção entre herança autossômica e ligada ao X é óbvia, pois depende apenas da localização cromossômica do gene. A expressão clínica de um gene anormal também depende de ele ser autossômico ou ligado ao X. Existem duas considerações, que serão discutidas em maiores detalhes mais adiante: (1) Os homens têm apenas um X e, portanto, são ditos **hemizigotos** com relação aos genes ligados ao X em vez de homozigotos ou heterozigotos. Os homens 46,XY nunca são heterozigotos para características ligadas ao X. (2) Para compensar o complemento duplo de genes ligados ao X nas mulheres, os alelos para a maioria dos genes ligados ao X são expressos por apenas um dos dois cromossomos X em qualquer célula determinada de uma mulher (ver **inativação do cromossomo X**, mais adiante), enquanto ambos os alelos da maioria dos loci autossômicos, mas não de todos, estão ativos (ver ***imprinting***, mais adiante).

Herança Dominante e Recessiva

Por definição, um fenótipo expresso do mesmo modo tanto em homozigotos quanto em heterozigotos é dominante, enquanto um fenótipo expresso apenas em homozigotos (ou, para características ligadas ao X, hemizigotos) é recessivo. Em genética médica, entretanto, esta definição é muito rígida para ser útil na prática. Em vez disso, qualquer fenótipo expresso em heterozigotos é classificado como dominante, tenham ou não os heterozigotos e homozigotos para o alelo mutante o mesmo fenótipo. De fato, os distúrbios autossômicos dominantes são tipicamente mais graves nos homozigotos que nos heterozigotos, e até agora apenas dois distúrbios autossômicos dominantes, a doença de Huntington (ver Cap. 12) e a adenomatose endócrina múltipla I, são conhecidos como sendo igualmente graves em ambos os genótipos. Quando o fenótipo devido a um genótipo heterozigoto é diferente do fenótipo visto em ambos os genótipos homozigotos e sua gravidade é intermediária a eles, o fenótipo pode ser descrito mais precisamente como sendo **incompletamente dominante**. Se a expressão de cada alelo puder ser detectada mesmo na presença do outro, os dois alelos serão chamados de **co-dominantes**.

Estritamente falando, é o fenótipo, e não o alelo, que é dominante ou recessivo. Entretanto, os alelos em geral são classificados como dominantes ou recessivos com base no fato de causarem uma mudança no fenótipo quando no estado heterozigoto ou homozigoto, respectivamente, e assim os termos "gene ou alelo dominante" e "gene ou alelo recessivo" são amplamente, embora de modo impróprio, usados.

A distinção entre herança dominante e recessiva não é absoluta. É uma designação arbitrária, baseada em fenótipos clínicos, que pode não ter significado no nível da ação gênica. Embora um fenótipo recessivo seja definido como sendo clinicamente indetectável em heterozigotos, muitas características classificadas como recessivas têm manifestações no heterozigoto quando examinadas no nível celular, bioquímico ou molecular. Por exemplo, o distúrbio bem conhecido de hemoglobina, a **anemia falciforme**, é herdado como uma doença autossômica recessiva (ver Cap. 11 para maior discussão). Os pacientes com a doença são homozigotos para um alelo defeituoso no locus de β-globina e, conseqüentemente, produzem a hemoglobina anormal S (Hb S) em vez da hemoglobina adulta normal A (Hb A) em suas hemácias, que se tornam falcêmicas sob condições de baixa tensão de oxigênio. Os heterozigotos produzem tanto Hb A quanto Hb S, uma proporção de suas hemácias apresenta o fenômeno falcêmico e eles têm anemia branda. Assim, no nível de síntese de hemoglobina, o alelo normal de β-globina e o alelo defectivo são expressos como alelos co-dominantes; no nível de funcionamento fisiológico, o alelo normal é incompletamente dominante (e o alelo anormal é incompletamente recessivo). No nível clínico, a anemia falciforme comporta-se como uma característica recessiva.

Muitos dos distúrbios autossômicos recessivos descritos hoje em dia são defeitos enzimáticos, nos quais parece haver uma margem de segurança grande o suficiente para permitir o funcionamento normal dos heterozigotos, muito embora apenas um de um par de alelos seja totalmente funcional e o outro (anormal) seja defeituoso ou não-funcional. Em contraste, nos distúrbios autossômicos dominantes, a doença ocorre a despeito da presença do produto gênico normal feito a partir do alelo normal

restante. De um modo geral, existem pelo menos quatro situações diferentes nas quais uma cópia normal do gene não é suficiente para evitar a doença:

1. A fisiologia normal requer mais de 50% do produto gênico totalmente ativo para evitar a doença. Não há margem de segurança grande o suficiente para permitir o funcionamento normal em heterozigotos, muito embora apenas um de um par de alelos seja totalmente funcional. Quando a perda de metade da atividade normal de uma proteína causa a doença, a situação é chamada de **haploinsuficiência**. Demonstrou-se que a haploinsuficiência ocorre em mutações nos genes que codificam alguns fatores de transcrição, proteínas estruturais e receptores de superfície celular.
2. Ao contrário de uma simples deficiência ou disfunção do produto proteico, uma proteína anormal pode ser sintetizada, causando um fenótipo anormal por interferir no funcionamento do produto do alelo normal (**efeito negativo dominante**), como é visto nas mutações do colágeno na osteogênese imperfeita ("doença dos ossos quebradiços") (ver Cap. 12).
3. A proteína mutante pode estar acentuada em uma ou mais de suas propriedades normais por meio de uma mutação (**simples ganho de função**), como na condição do nanismo acondroplásico, ou tornar-se tóxica para a célula pela aquisição de uma propriedade, como na doença de Huntington (ver Cap. 12).
4. Uma disfunção herdada de uma cópia de alguns genes autossômicos pode resultar em heredogramas com cânceres de herança dominante (p. ex., retinoblastoma; ver Cap. 16). A perda aleatória do outro alelo normal, mesmo se um evento extremamente raro ocorrer em apenas algumas células, elimina ambas as cópias do gene nas células e torna-as cancerosas. Assim, embora a predisposição ao câncer seja herdada de modo dominante, as mutações que levam ao câncer são recessivas em nível celular, pois ambas as cópias do gene devem estar disfuncionais para que o câncer se desenvolva.

Em resumo, a distinção entre um alelo dominante e um recessivo mutante é na verdade uma só: nos heterozigotos, com um alelo normal e um mutante, a metade da quantidade normal do produto gênico do alelo normal é suficiente para efetuar uma determinada função? Se a resposta for sim, o alelo mutante (e seu distúrbio associado) será chamado de recessivo. Se o alelo mutante causar a doença, a despeito de haver um alelo selvagem funcionando normalmente, a resposta será não, e o alelo (e a doença) será chamado de dominante.

Outros Padrões de Heredograma

Às vezes um padrão de heredograma simula um padrão monogênico, muito embora o distúrbio não tenha uma base monogênica. Deste modo é fácil se confundir por efeitos teratogênicos; por alguns tipos de distúrbios cromossômicos herdados, tais como translocações balanceadas ou microdeleções que causam raras **síndromes de genes contíguos** (ou **síndromes de microdeleção**), nas quais há uma deleção de múltiplos genes em loci proximamente ligados (ver Cap. 10); ou por exposições ambientais compartilhadas pelos membros familiares. Os distúrbios monogênicos herdados em geral podem ser diferenciados dos outros tipos de distúrbios familiares por suas taxas de segregação tipicamente mendelianas nas famílias. A confirmação de que uma doença deve-se a mutações em um único gene eventualmente pode requerer a demonstração de defeitos no nível do produto gênico ou do gene.

Muitos pacientes com distúrbios genéticos não têm parentes afetados de modo similar, mas ainda pode ser possível reconhecer que o distúrbio é genético. Em função de uma marcante semelhança de fenótipo entre famílias diferentes com o mesmo defeito, padrões bem estabelecidos de herança em outras famílias com o mesmo distúrbio em geral podem ser usados como base para o diagnóstico e a consulta, mesmo se o paciente for um caso isolado na família.

Idade de Início e Outros Fatores que Afetam os Padrões de Heredogramas

Idade de Início

Nem todos os distúrbios genéticos são congênitos. Muitos só se expressam mais tarde na vida, alguns em uma idade característica e outros em idades variáveis. Como os termos "genético" e "congênito" são freqüentemente confundidos, é importante ter em mente que um distúrbio genético é aquele que é determinado pelos genes, enquanto um distúrbio congênito é meramente um que esteja presente ao nascimento, que pode ou não ter uma base genética.

Muitos distúrbios genéticos desenvolvem-se na fase pré-natal e, assim, são tanto genéticos quanto congênitos. Fenótipos dismórficos de muitos tipos originam-se durante o desenvolvimento e são reconhecidos ao nascimento (ou mesmo no período pré-natal, em alguns casos, por ultra-sonografia; ver Cap. 18) como "defeitos de nascimento". Alguns distúrbios genéticos podem ser letais na vida pré-natal. Outros são expressos tão logo a criança começa sua vida independente. Outros, ainda, aparecem mais tarde ou têm seu aparecimento clínico em uma variedade de idades, desde o nascimento até os anos pós-reprodutivos.

Outros Fatores que Afetam os Padrões de Heredograma

Embora como regra geral os heredogramas de distúrbios monogênicos possam ser prontamente classificados como autossômicos ou ligados aos X e como dominantes ou recessivos, o padrão de herança de um heredograma individual pode ser obscurecido por vários outros fatores que podem dificultar a interpretação do modo de herança. A segregação dos genes dos genitores para seus filhos por meio dos gametas é um processo aleatório e, especialmente com o pequeno tamanho típico da maioria das famílias dos países desenvolvidos de hoje em dia, o paciente pode ser o único membro afetado. O padrão de herança, se houver, pode não ser imediatamente aparente. Alguns outros pontos a ter em mente são os seguintes: uma mutação nova não é uma causa infreqüente de doença dominante e ligada ao X; as dificuldades diagnósticas podem ocorrer em função de uma expressão ausente ou variável do gene envolvido; outros genes e fatores ambientais podem afetar a expressão do gene; pessoas com alguns genótipos podem não sobreviver até o nascimento; pode estar faltando uma informação precisa sobre a presença do distúrbio em parentes ou sobre as relações familiares.

Heterogeneidade Genética

Quando um distúrbio genético que parece ser uma entidade única é mais bem estudado, com freqüência descobre-se que ele é

geneticamente heterogêneo. Isto é, inclui vários fenótipos que são similares, mas que de fato são determinados por genótipos diferentes. A heterogeneidade genética pode ser o resultado de mutações diferentes no mesmo locus (**heterogeneidade alélica**), de mutações em loci diferentes (**heterogeneidade de locus**), ou de ambos. O reconhecimento da heterogeneidade genética é um aspecto importante do diagnóstico clínico e da consulta genética (ver Cap. 12, Quadro 12.2).

HETEROGENEIDADE DE LOCUS

Para muitos fenótipos, apenas a análise dos heredogramas tem sido suficiente para demonstrar a heterogeneidade genética. Por exemplo, a **retinite pigmentosa**, uma causa comum de prejuízo visual causada por degeneração de fotorreceptor associada à distribuição anormal de pigmento na retina, há muito tem sido conhecida como um distúrbio que ocorre nas formas autossômica dominante, autossômica recessiva e ligada ao X. Nos últimos anos, demonstrou-se que a heterogeneidade é mais ampla. A análise de DNA demonstrou que há uma probabilidade de pelo menos 3 formas ligadas ao X, 12 formas autossômicas dominantes e 5 formas autossômicas recessivas de retinite pigmentosa que não estão associadas e outras anomalias fenotípicas. Se incluirmos os distúrbios nos quais a retinite pigmentosa é encontrada em conjunto com outros defeitos, tais como retardo mental ou surdez, o número de doenças genéticas diferentes que manifestam retinite pigmentosa ficará bem acima de 30! A **síndrome de Ehlers-Danlos**, na qual a pele e outros tecidos conjuntivos podem ser excessivamente elásticos ou frágeis devido a um defeito subjacente da estrutura do colágeno, também pode ser autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X, e a análise em níveis clínicos e moleculares mostraram que existem mais de 10 loci diferentes associados ao distúrbio.

HETEROGENEIDADE ALÉLICA

A heterogeneidade alélica é uma causa importante de variação clínica. Muitos loci possuem mais de um alelo mutante. De fato, em um determinado locus pode haver algumas ou muitas mutações. Às vezes estas mutações diferentes resultam em distúrbios clinicamente indistinguíveis ou bastante similares. Em outros casos, alelos mutantes diferentes no mesmo locus resultam em apresentações clínicas bem diferentes. Por exemplo, algumas mutações no gene *RET*, que codifica um receptor de tirosina cinase, pode causar uma insuficiência dominantemente herdada de desenvolvimento dos gânglios colônicos, levando a uma motilidade colônica defeituosa e uma grave constipação crônica (**doença de Hirschsprung**) (ver Cap. 15), enquanto outras mutações no mesmo gene resultam em câncer de herança dominante da tireóide e das glândulas supra-renais (**neoplasia endócrina múltipla tipos IIa e IIb**) (ver Cap. 16). Um terceiro grupo de mutações em *RET* causa tanto doença de Hirschsprung quanto neoplasia endócrina múltipla nas mesmas pessoas.

A menos que tenha genitores consangüíneos, a maioria das pessoas com distúrbios autossômicos recessivos tem mais probabilidade de ter genótipos compostos do que verdadeiramente homozigotos, embora para a maioria das finalidades estas pessoas em geral ainda sejam chamadas de homozigotas, se tiverem um par de alelos anormais em um locus. Como combinações alélicas diferentes podem ter conseqüências clínicas um tanto diferentes, os clínicos devem estar cientes da heterogeneidade alélica como uma possível explicação para a variabilidade entre pacientes considerados como portadores da mesma doença.

HERANÇA AUTOSSÔMICA RECESSIVA

Começaremos com os fenótipos autossômicos recessivos porque, embora sejam menos comuns que os autossômicos dominantes, seu padrão de herança e mecanismo de doença em geral são mais bem compreendidos em termos moleculares. Como foi discutido na seção anterior, a doença autossômica recessiva ocorre apenas nos homozigotos, pessoas com dois alelos mutantes e nenhum alelo normal, porque nestas doenças uma cópia do gene normal em um heterozigoto é capaz de compensar o alelo mutante e evitar que a doença ocorra. Como uma pessoa herda apenas um dos dois alelos em um locus de um genitor, os homozigotos devem herdar um alelo mutante de cada genitor (bloqueando a nova mutação rara). Um heredograma típico ilustrando a herança autossômica recessiva é mostrado na Fig. 5.3. Ambos os genitores de uma pessoa afetada são heterozigotos (**portadores**). O risco de cada um de seus filhos receber um alelo recessivo é de 50% de cada genitor e, portanto, a chance de herdar dois alelos recessivos e ser afetado é de 1/2 × 1/2 ou 1 em 4. O probando pode ser o único membro da família afetado, mas se outros forem afetados, eles em geral estarão entre seus irmãos e não em outra parte da família, a menos que a família seja altamente endogâmica.

Embora qualquer reprodução na qual cada genitor tenha pelo menos um alelo recessivo possa produzir prole homozigota afe-

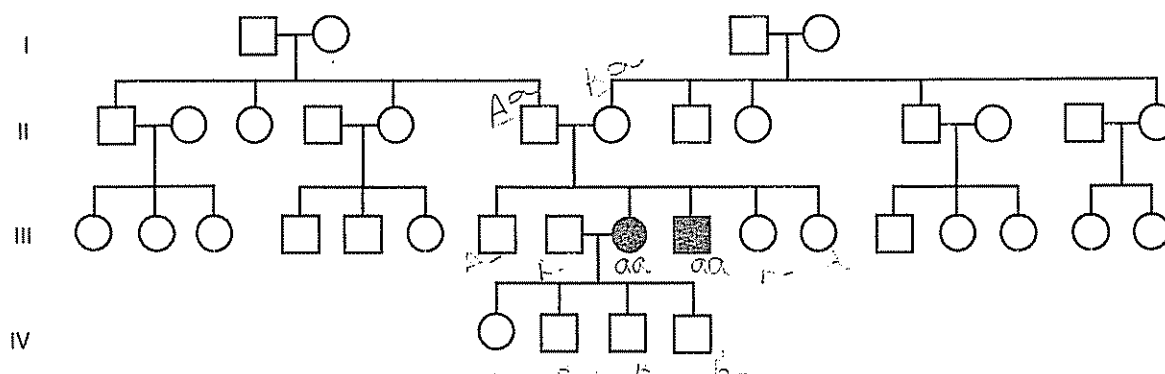



Fig. 5.3 Heredograma típico mostrando herança autossômica recessiva.

tada, o mais comum é a reprodução de dois portadores não-afetados. Os três tipos de reprodução, com o risco para a prole em cada caso, são mostrados aqui. O alelo recessivo mutante é simbolizado por *r* e seu alelo dominante normal, por *R*.

Genitores	Risco para a Prole
Portador × portador: *R/r* × *R/r*	1/4 *R/R*, 1/2 *R/r*, 1/4 *r/r* 3/4 não-afetados, 1/4 afetados
Portador × afetado: *R/r* × *r/r*	1/2 *R/r*, 1/2 *r/r* 1/2 não-afetados, 1/2 afetados
Afetado × afetado: *r/r* × *r/r*	Só *r/r* Todos afetados

Freqüência Gênica e Freqüência de Portadores

Os portadores de genes autossômicos recessivos não são clinicamente reconhecíveis, mas são muito mais comuns que os homozigotos afetados. O alelo mutante responsável por um distúrbio recessivo em geral é raro e, portanto, a chance de que uma pessoa tenha duas cópias de um alelo raro mutante é muito menor do que a chance de que ela herde um alelo normal e um mutante. (Discutiremos como calcular as freqüências reais de portadores e da doença no Cap. 7.) Como um distúrbio autossômico recessivo deve ser herdado de *ambos os genitores*, o risco de que qualquer portador tenha um filho afetado depende, em parte, da chance de que seu cônjuge também seja portador da condição. Assim, conhecer a freqüência de portadores de uma doença é clinicamente importante para a consulta genética.

O distúrbio autossômico recessivo mais comum em crianças caucasianas é a **fibrose cística** (**CF**) (ver Cap. 12). A CF é desconhecida nas populações asiáticas e é relativamente rara nas populações afro-americanas, mas nas populações caucasianas cerca de 1 criança em 2.000 tem dois alelos CF mutantes e tem a doença. A freqüência de portadores pode ser calculada como sendo de aproximadamente 1/22 (ver Cap. 7). Em uma população de 2.000 caucasianos, então, espera-se um paciente com CF, 90 portadores não-afetados da mutação CF e 1.909 homozigotos normais. Como um paciente tem dois alelos CF e um portador só tem um, 90/92 (cerca de 98%) de todos os genes CF nesta população de 2.000 indivíduos estão escondidos nos portadores (que em geral não sabem disso) e apenas 2% estão nos pacientes.

Consangüinidade e Endogamia

Como já foi discutido, a grande maioria dos alelos mutantes responsáveis pelos distúrbios autossômicos recessivos está nos portadores e não nos homozigotos. Os alelos mutantes podem ser transmitidos nas famílias por várias gerações sem que nunca apareçam na forma homozigota. A presença de tais genes recessivos escondidos não é revelada, a menos que o portador se case com outro portador do alelo mutante no mesmo locus e ambos os alelos deletérios sejam herdados por uma criança. Sabemos, por estudos da prole de reproduções incestuosas, que todos nós temos pelo menos de oito a dez alelos mutantes para distúrbios autossômicos recessivos bem conhecidos e facilmente reconhecíveis. O número total de mutações gênicas deletérias recessivas portadas por uma pessoa certamente é maior que esta estimativa mínima.

Consangüinidade

A chance de que ambos os genitores sejam portadores de um alelo mutante no mesmo locus aumentará substancialmente se os genitores forem parentes e cada um tiver herdado o alelo mutante a partir de um ancestral comum, uma situação chamada de **consangüinidade**. A consangüinidade dos genitores de um paciente com um distúrbio genético é uma forte evidência (embora não uma prova) de herança autossômica recessiva desta condição. Por exemplo, o distúrbio no heredograma da Fig. 5.4 provavelmente é de uma característica autossômica recessiva, muito embora outras informações no heredograma possam parecer insuficientes para estabelecer este padrão de herança. Mesmo que os genitores considerem-se não-aparentados, eles podem ter um ancestral comum nas últimas gerações, especialmente se forem de origem étnica ou geográfica similar próxima. Assim, ao colher uma história familiar, é importante perguntar sobre a consangüinidade e a origem.

Embora na maioria das populações das sociedades ocidentais de hoje a incidência de casamentos consangüíneos seja baixa, ela tem sido relativamente comum em alguns grupos étnicos; por exemplo, no Japão, no sudeste da Índia e no Oriente Médio. Na época atual, a taxa de casamentos de primos em primeiro grau e de consangüíneos em geral está declinando em muitas sociedades tradicionais.

Uma nota de cautela: é importante reconhecer que a consangüinidade não é a explicação mais comum para uma característica autossômica recessiva. A reprodução entre pessoas não-aparentadas, cada uma das quais pode por acaso ser portadora, contribui para a maioria dos casos de doença autossômica recessiva, particularmente se uma característica recessiva tiver uma alta freqüência na população. Assim, a maioria das pessoas afetadas por um distúrbio relativamente comum, tal como a CF, *não* é o resultado de consangüinidade, pois o alelo mutante é muito comum na população em geral. A consangüinidade é encontrada com mais freqüência nos antecedentes de pacientes com condições muito raras. No xeroderma pigmentoso, uma rara condição autossômica recessiva de reparo do DNA (ver Cap. 16 e Quadro 9.6), por exemplo, mais de 20% dos casos são relatados como resultantes de casamentos entre primos em primeiro grau.

Embora as pesquisas genealógicas tragam alguma luz sobre a história da espécie humana como uma única família, o risco genético para a prole de casamentos consangüíneos entre pessoas aparentadas não é tão grande quanto às vezes se imagina. Os riscos absolutos de prole anormal (natimorto, morte neonatal e

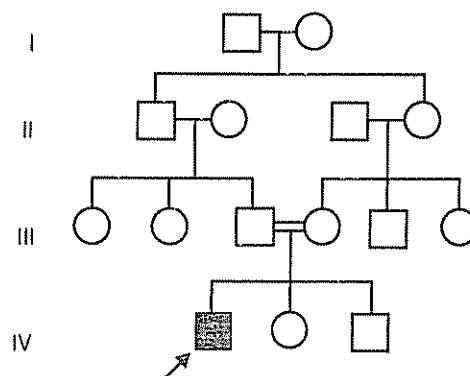



Fig. 5.4 Heredograma no qual a consangüinidade sugere herança autossômica recessiva

malformações congênitas) para casamentos entre primos em primeiro grau são de 3% a 5%, cerca do dobro do risco geral de 2% a 3% para a prole de um casal não-aparentado (ver Cap. 19). A consangüinidade no nível de primos em terceiro grau ou parentescos mais remotos não é considerada como sendo geneticamente significativa, e o risco aumentado de prole anormal é desprezível em tais casos. Ainda assim, muitas pessoas que são homozigotas para um alelo raro podem muito bem tê-lo herdado de ambos os genitores vindo de um ancestral comum que era heterozigoto.

A Medida da Consanguinidade

A medida da consangüinidade é relevante em genética médica porque o risco de uma criança ser homozigota para algum alelo recessivo raro é proporcional ao grau de parentesco dos genitores. Alguns tipos de reproduções consangüíneas que têm um risco aumentado são mostrados na Fig. 5.5.

O **coeficiente de endogamia** (F) é a probabilidade de que um homozigoto tenha recebido ambos os alelos em um locus da mesma fonte ancestral. É também a proporção de loci nos quais uma pessoa é homozigota ou **idêntica por descendência**. Na Fig. 5.6, a pessoa IV-1 é a prole de um casamento de primos em primeiro grau. Para qualquer alelo específico que seu pai possua, a chance de que sua mãe também tenha herdado o mesmo alelo *da mesma fonte* é de 1/8. Assim, para qualquer gene que o pai passe para sua prole, a chance de que a mãe transmita o mesmo alelo é de 1/8 (a chance de que ela tenha o alelo) × 1/2 (a chance de que ela o transmita) = 1/16. Este é o coeficiente de endogamia para o filho de primos em primeiro grau. Isso significa que a prole de um casamento entre primos em primeiro grau tem uma chance de 1/16 de ser homozigota por descendência em qualquer locus ou, alternativamente, que o filho seja homozigoto em 1/16 (cerca de 6%) de seus loci. Um modo alternativo de chegar à mesma conclusão (e ao mesmo coeficiente F) é considerar que cada um dos quatro alelos no locus A na geração I tem uma chance de 1/64 de ser homozigoto em IV-1. Assim, a probabilidade de que IV-1 seja homozigoto para qualquer um dos quatro alelos é 4 × 1/64 = 1/16. O Quadro 5.1 mostra os coeficientes de endogamia para a prole de vários casamentos consangüíneos. Se uma pessoa é endogâmica por mais de uma linha de descendência, os coeficientes separados são somados para encontrar seu coeficiente total de endogamia.

Distúrbios Recessivos Raros em Isolados Genéticos

Existem muitos grupos pequenos nos quais a freqüência de alguns genes recessivos raros é bem diferente da população em geral. Tais grupos, **isolados** genéticos, podem ter se separado de seus vizinhos por barreiras geográficas, religiosas ou lingüísticas. Embora tais populações não sejam, estritamente falando, consangüíneas, a chance de se reproduzirem com outro portador de uma determinada condição recessiva pode ser tão alta como a observada nos casamentos entre primos.

Por exemplo, entre os judeus Ashkenazi dos EUA, o gene para a **doença de Tay-Sachs** (gangliosidose GM_2) é muito comum. A doença de Tay-Sachs é um distúrbio degenerativo neurológico autossômico recessivo que se desenvolve quando a criança tem cerca de 6 meses de idade. As crianças afetadas desenvolvem cegueira e regridem mental e fisicamente (ver Cap. 12). A doença é fatal no início da infância. A freqüência da doença de Tay-Sachs é 100 vezes mais alta nos judeus Ashkenazi (1 em 3.600) do que na maioria das outras populações (1 em 360.000). Assim, a freqüência de portadores entre os judeus Ashkenazi é de aproximadamente 3% (calculada como descrito no Cap. 7).

Quando uma característica recessiva tem uma alta freqüência em uma população, a consangüinidade em geral não é uma característica marcante nos heredogramas com a característica. Conseqüentemente, entre os judeus Ashkenazi, os pais das crianças afetadas em geral não são consangüíneos próximos, enquanto em outras populações nas quais a freqüência de portadores é muito baixa, como em Quebec, Canadá, a taxa de con-

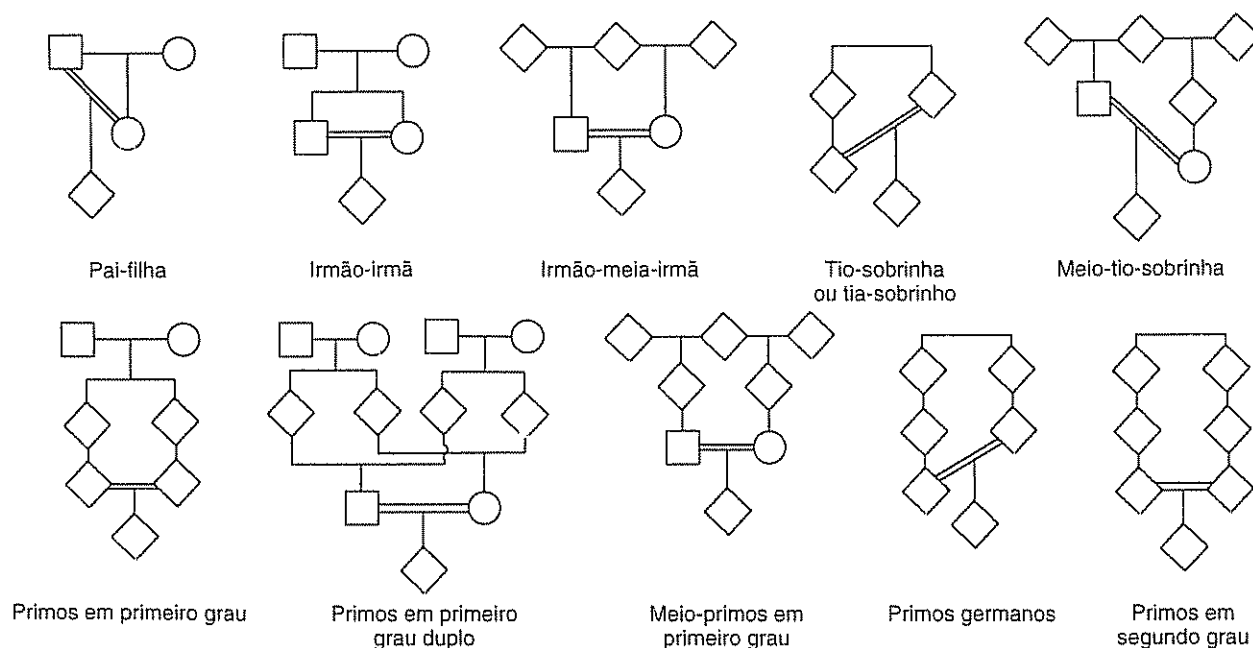



Fig. 5.5 Tipos de casamentos consangüíneos. A probabilidade de que a prole de cada um destes casamentos seja homozigota por descendência em qualquer locus é igual ao coeficiente de endogamia, F

sangüinidade nos genitores de pacientes portadores de Tay-Sachs é alta.

Embora façamos uma distinção entre a consangüinidade que ocorre dentro de uma família e a endogamia, que ocorre entre indivíduos não-aparentados em um isolado genético, em ambas as situações existe um risco aumentado de reprodução entre heterozigotos portadores de distúrbios autossômicos recessivos. Para medir o risco em populações endogâmicas, o conceito de coeficientes de endogamia pode ser expandido para incluir populações, bem como parentes em famílias, e alguns exemplos são dados no Quadro 5.2. Assim, pessoas de uma população mais ou menos restrita podem ter um coeficiente F significativo, muito embora não se imaginem consangüíneos. Para algumas populações altamente endogâmicas, o valor médio do coeficiente F é tão alto ou mais alto que o valor para filhos de primos em segundo grau. Por exemplo, F = 0,04 para os samaritanos, um grupo de apenas 500 pessoas que ficaram geneticamente isolados por mais de 3.000 anos, em comparação com 0,016 para a prole de primos em segundo grau. No Japão, F é de cerca de 0,005 (0,5%), o que indica que, em média, uma pessoa japonesa é homozigota por descendência em até 250 loci.

Distúrbios Influenciados pelo Sexo

Embora os distúrbios autossômicos recessivos em geral ocorram com freqüência igual em homens e mulheres, alguns fenótipos autossômicos recessivos são influenciados pelo sexo, isto é, expressam-se em ambos os sexos, mas com freqüências diferentes. Entre os distúrbios autossômicos, a **hemocromatose** é um exemplo de um fenótipo mais comum nos homens. Neste distúrbio autossômico recessivo comum do metabolismo do ferro, há uma absorção aumentada do ferro da dieta, que leva a uma sobrecarga de ferro com graves conseqüências patológicas. A incidência mais baixa do distúrbio clínico nas mulheres (um décimo da incidência vista nos homens) é tida como estando relacionada a uma ingestão dietética de ferro mais baixa e a um aumento da perda de ferro por meio da menstruação.

Análise de Segregação

Nem sempre é óbvio pela inspeção se um heredograma reflete uma herança autossômica recessiva ou outra forma de herança

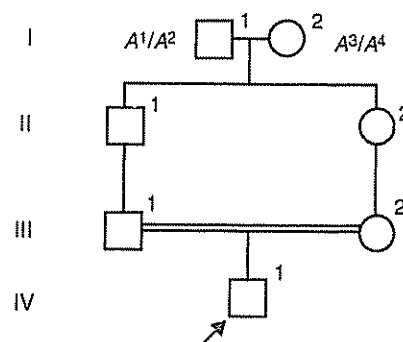



Fig. 5.6 Um casamento entre primos, usado no texto para demonstrar como calcular o coeficiente de endogamia, F, do filho IV-1.

A **análise de segregação** é um método estatístico que usa a freqüência e distribuição de indivíduos afetados e não-afetados nas famílias para determinar o modo mais provável de herança. Os padrões de herança resultam da transmissão de alelos de uma geração para a outra. Grande parte da genética é, portanto, o resultado de pequenas probabilidades. Uma pessoa tem uma certa probabilidade de herdar um alelo *versus* outro alelo ou uma certa probabilidade de desenvolver um fenótipo ou outro. Para estudar tais processos, os geneticistas tomam como base uma formulação matemática que é freqüentemente usada para descrever tais processos: o **teorema binomial**. A seção que se segue faz uma introdução básica ao teorema binomial e aplica-o a um exemplo simples de análise de segregação. Ele também é usado em genética de populações (ver Cap. 7) e no mapeamento gênico por ligação (ver Cap. 8).

Teorema Binomial

Suponha que existam dois resultados alternativos de um experimento, o "sucesso" ocorrendo com a probabilidade p e o "fracasso" ocorrendo com a probabilidade q. Como só existem dois resultados possíveis, $p + q$ deve ser igual a 1. Portanto, $q = 1 - p$. Da primeira vez que o experimento é feito, a probabilidade de um sucesso é p e a probabilidade de um fracasso é q. Se o experimento for feito duas vezes, a probabilidade de dois

QUADRO 5-1

Casamentos Consangüíneos

Tipo	Grau de Parentesco	Proporções de Genes em Comum	Coeficiente de Endogamia da Criança (F)
Gêmeos MZ	—	1	—
Genitor-filho	1.°	1/2	1/4
Irmão-irmã (incluindo gêmeos dizigóticos)	1.°	1/2	1/4
Irmão-meia-irmã	2.°	1/4	1/8
Tio-sobrinha ou tia-sobrinho	2.°	1/4	1/8
Meio-tio-sobrinha	3.°	1/8	1/16
Primos em 1.° grau	3.°	1/8	1/16
Primos em 1.° grau duplos	2.°	1/4	1/8
Meio-primos em 1.° grau	4.°	1/16	1/32
Primos germanos	4.°	1/16	1/32
Primos em 2.° grau	5.°	1/32	1/64

Coeficientes de endogamia para a prole de vários casamentos consangüíneos. Se uma pessoa for endogâmica por mais de uma linhagem de descendência, os coeficientes separados serão somados para que se encontre seu coeficiente total de endogamia.

QUADRO 5-2

Exemplos de Coeficientes de Endogamia (F) para Algumas Populações Humanas

População	F
Canadá	
Católica romana	0,00004-0,0007
EUA	
Católica romana	0-0,0008
Huteritas	0,02
Dunkers (Pensilvânia)	0,03
América Latina	0-0,003
Sudeste da Europa	0,001-0,002
Japão	0,005
Índia (Andhra Pradesh)	0,02
Samaritanos	0,04

sucessos será $p \times p = p^2$, de dois fracassos será q^2 e de um sucesso e um fracasso será $2 \times p \times q$ (o fator 2 vem de dois modos de haver um sucesso e um fracasso: o sucesso pode vir no primeiro experimento e o fracasso no segundo ou vice-versa). Com três experimentos, a chance de três sucessos será $p \times p \times p = p^3$; de três fracassos será q^3; sucesso e dois fracassos será $3 \times pq^2$ (porque o sucesso pode vir no primeiro, no segundo ou no terceiro experimento); e, similarmente, dois sucessos e um fracasso será $3p^2q$. Em termos gerais, quando existem dois eventos alternativos, um com probabilidade p e o outro com probabilidade $1 - p = q$, as freqüências de possíveis combinações de p e q em n tentativas são dadas pelos termos individuais da expansão de $(p + q)^n$. Esta formulação de probabilidades de uma série de experimentos baseados na probabilidade dos resultados de um único experimento é o **teorema binomial**.

Aplicação do Teorema Binomial à Análise de Segregação

Examinaremos agora um exemplo simples do uso do teorema binomial na análise de segregação para um problema clinicamente relevante. Suponha que alguém queira determinar se um determinado distúrbio cujo padrão de herança ainda não foi estabelecido é autossômico recessivo. Fazemos isto examinando se a doença ocorre na prole nas proporções que se ajustam à expectativa de 25% de herança autossômica recessiva.

Supondo uma herança recessiva, que proporção das famílias com três filhos teria 0, 1, 2 e 3 filhos afetados? De acordo com o enfoque usado antes, p (chance de filho clinicamente normal) = 3/4, q (chance de filho afetado) = 1/4, $n = 3$ e $(p + q)^3 = p^3 + 3p^2q + 3pq^2 + q^3$. Assim, o que teoricamente se espera, com base na herança autossômica recessiva, é que

27/64 (42%) de todas estas famílias não tenham nenhum filho afetado;
27/64 (42%) das famílias tenham 1 filho afetado;
9/64 (14%) tenham 2 filhos afetados;
1/64 (2%) tenham 3 filhos afetados.

Determinamos as proporções esperadas de filhos afetados em famílias com três filhos de genitores que são portadores de um distúrbio autossômico recessivo. Suponha, entretanto, que só agora incluímos ("avaliação") uma família em nosso estudo quando já havia pelo menos um filho afetado. Então 27 das 64 famílias com risco (42%) não serão incluídas no estudo porque nós nem sabíamos que os genitores eram portadores. Das 37 famílias restantes podemos avaliar que:

27 (73%) tenham 1 filho afetado;
9 (24%) tenham 2 filhos afetados;
1 (3%) tenha 3 filhos afetados.

No grupo de avaliação, então, o número total de filhos afetados entre 111 crianças de 37 famílias é 27×1 afetados + (9×2 afetados) + (1×3 afetados) = 48 afetados dentre 111 crianças, ou 43%, bem maior que os 25% teoricamente esperados para herança autossômica recessiva. Este é um exemplo de **tendenciosidade de averiguação**, que devemos evitar em pesquisas médicas, especialmente em genética médica. Nos testes para herança autossômica recessiva, as proles sem membros afetados são invariavelmente omitidas. O problema pode ser ainda pior se, como pode ocorrer ocasionalmente, a chance de avaliação de uma prole puder ser mais alta quando ela tem dois ou mais membros afetados do que quando só tem um. Vários métodos estatísticos para corrigir a tendenciosidade sob diferentes condições de averiguação são conhecidos e estes métodos são descritos em muitos textos de estatística.

Características da Herança Autossômica Recessiva

1. Um fenótipo autossômico recessivo, se aparecer em mais de um membro de uma família, é visto tipicamente apenas nos irmãos do probando, e não nos seus genitores, na sua prole ou em outros parentes.
2. Para a maioria das doenças autossômicas recessivas, homens e mulheres têm a mesma chance de ser afetados.
3. Os genitores de um filho afetado são portadores assintomáticos de alelos mutantes.
4. Os genitores da pessoa afetada podem, em alguns casos, ser consangüíneos. Isto é especialmente provável se o gene responsável pela condição for raro na população.
5. O risco de recorrência para cada irmão do probando é de 1 em 4.

PADRÕES DE HERANÇA AUTOSSÔMICA DOMINANTE

Dentre os cerca de 6.000 fenótipos mendelianos conhecidos, mais da metade são características autossômicas dominantes. A incidência de alguns distúrbios autossômicos dominantes é bem alta, pelo menos em áreas geográficas específicas: por exemplo, 1 em 500 para hipercolesterolemia familiar em populações descendentes de europeus ou japoneses; mais de 1 em 1.000 para distrofia miotônica em alguma parte dos EUA e cerca de 1 em 2.500 a 3.000 para várias condições, tais como doença de Huntington (em populações de origem da Europa setentrional), neurofibromatose e doença do rim policístico. Embora muitos distúrbios autossômicos dominantes sejam individualmente muito menos comuns, eles são tão numerosos que, em conjunto, sua incidência total é apreciável. A carga dos distúrbios autossômicos dominantes é ainda mais aumentada devido

à sua natureza hereditária. Elas podem ser transmitidas por famílias e se tornar um problema não só para as pessoas, mas para a família inteira, em geral ao longo de muitas gerações. Em alguns casos, a carga é composta por dificuldades sociais resultantes de deficiências físicas ou mentais.

Na herança autossômica dominante típica, cada pessoa afetada em um heredograma tem um genitor afetado, que também tem um genitor afetado, e assim por diante, até onde se possa acompanhar o distúrbio ou até a ocorrência da mutação original. Isto também é verdade, como será discutido mais adiante, nos heredogramas de herança dominante ligada ao X. A herança autossômica dominante pode ser distinta da dominante ligada ao X, entretanto, pela **transmissão de homem a homem**, que obviamente é impossível na herança ligada ao X, pois os homens transmitem o cromossomo Y, e não o X, para seus filhos.

A maioria das mutações causadoras de doenças é rara na população em comparação com os alelos normais. Sendo *A* o alelo mutante e *a* o alelo normal, as reproduções que geram filhos com uma doença autossômica dominante são, portanto, em geral entre um heterozigoto para a mutação (*A/a*) e um homozigoto para um alelo normal (*a/a*). A prole esperada de uma reprodução *A/a* × *a/a* é dada no quadro que se segue.

Prole da Reprodução *A/a* × *a/a*

		Genitor Normal *a/a*	
		a	*a*
Genitor Afetado *A/a*	*A*	*A/a* Afetado	*A/a* Afetado
	a	*a/a* Normal	*a/a* Normal

Cada filho desta reprodução tem 50% de chance de receber o alelo anormal *A* do genitor afetado e, portanto, ser afetado (*A/a*) e 50% de chance de receber o alelo normal *a* e, portanto, não ser afetado (*a/a*). (O genitor não-afetado pode transmitir apenas um alelo normal *a* para cada filho.) Estatisticamente falando, cada gestação é um "evento independente", não-governado pelo resultado das gestações anteriores. Assim, em uma família, a distribuição de crianças afetadas e não-afetadas pode ser bem diferente da teórica 1:1, embora na população como um todo a prole de genitores *A/a* × *a/a* seja de aproximadamente 50% *A/a* e 50% *a/a*. A herança autossômica dominante típica pode ser vista no heredograma de uma família com surdez hereditária (Fig. 5.7).

Mutação Nova em Distúrbios Autossômicos Dominantes

Em qualquer população, novos alelos surgem por mutação e são mantidos ou removidos por seleção. Após o surgimento de uma nova mutação, sua sobrevida na população depende da **adaptabilidade** das pessoas que a possuem em comparação com a das pessoas que possuem outros alelos no locus envolvido.

A adaptabilidade de uma condição é medida pelo número de prole de pessoas afetadas que sobrevivem até a idade reprodutiva em comparação com um grupo controle apropriado. Muitos distúrbios autossômicos dominantes estão associados com a redução da adaptabilidade. Há uma relação inversa entre a adaptabilidade de um determinado distúrbio autossômico dominante e a proporção de todos os pacientes com este distúrbio que têm genes mutantes novos. Quando um distúrbio reduz a adaptabilidade reprodutiva das pessoas afetadas, uma proporção de todos os afetados provavelmente recebeu o gene defeituoso como uma mutação nova em um gameta de um genitor genotipicamente normal. Alguns distúrbios têm uma adaptabilidade zero. Em outras palavras: os pacientes com tais distúrbios nunca se reproduzem. Essencialmente todos os casos observados de um distúrbio com adaptabilidade zero são, portanto, devidos a mutações novas, porque as mutações não podem ser herdadas. Outros distúrbios têm adaptabilidade reprodutiva virtualmente normal por causa do início em idade mais avançada nos casos típicos. Quando a adaptabilidade é normal, o distúrbio raramente é visto como resultado de mutação nova; é muito mais provável que o paciente tenha herdado o distúrbio do que tenha um novo gene mutante. A medida da freqüência de mutação e a relação entre a freqüência de mutação com a adaptabilidade serão mais discutidas no Cap. 7.

Variabilidade de Manifestações Fenotípicas de Genes Mutantes: Penetrância, Expressividade e Pleiotropia

Muitas condições genéticas segregam-se nitidamente nas famílias. Isto é, o fenótipo anormal pode ser claramente distinto do normal. Na experiência clínica, entretanto, alguns distúrbios não são expressos em pessoas geneticamente predispostas e outros têm uma expressão extremamente variável em termos de gravidade clínica ou idade de início, ou ambos. A expressão de um genótipo anormal pode ser modificada pelos efeitos do envelhecimento, outros loci genéticos e os efeitos do ambiente. Estas

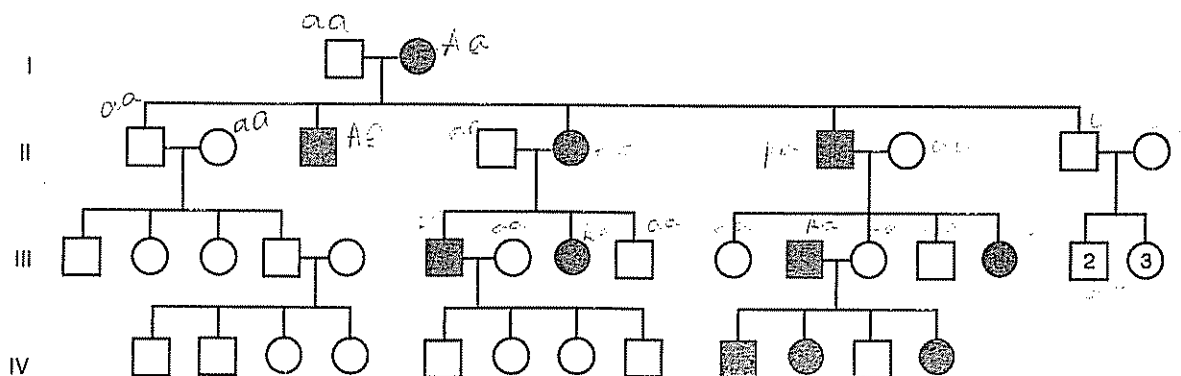



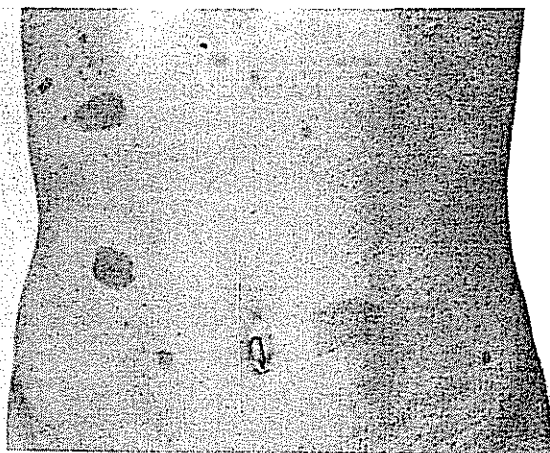
Fig. 5.7 Heredograma mostrando herança típica de uma forma de surdez neurossensorial progressiva (DFNA1) herdada como uma característica autossômica dominante

diferenças de expressão, que são particularmente características de distúrbios autossômicos dominantes, embora de modo algum restritos a eles, em geral podem levar a dificuldades de diagnóstico e interpretação de heredogramas. Existem muitos modos diferentes pelos quais tais diferenças de expressão podem ocorrer: **penetrância reduzida**, **expressividade variável** e **pleiotropia**.

A **penetrância** é a probabilidade de que um gene tenha qualquer expressão fenotípica. Quando a freqüência de expressão de um fenótipo é menor que 100%, isto é, quando algumas pessoas que têm o genótipo apropriado não o expressam em absoluto, diz-se que o gene apresenta **penetrância reduzida**. A penetrância é um conceito de tudo ou nada. Em termos estatísticos, é a porcentagem de pessoas com um determinado genótipo que são afetadas, pelo menos em algum grau.

A **expressividade** é a gravidade da expressão do fenótipo. Quando a gravidade da doença difere nas pessoas que têm o mesmo genótipo, o fenótipo é dito como tendo **expressividade variável**. Mesmo dentro de uma família, um distúrbio pode variar em gravidade em relação a qualquer manifestação.

Quando um único gene anormal — ou um par de genes anormais — produz efeitos fenotípicos diversos, tais como quais sistemas orgânicos são envolvidos e que sinais e sintomas particulares ocorrem, sua expressão é dita como sendo **pleiotrópica**. Cada gene tem apenas um efeito primário: ele dirige a síntese de uma cadeia polipeptídica ou uma molécula de RNA. A partir deste efeito primário, entretanto, podem haver múltiplas conseqüências. Na mesma família, duas pessoas portando os mesmos genes mutantes podem ter alguns sinais e sintomas em comum, embora outras manifestações da doença possam ser bem diferentes, dependendo de quais tecidos ou órgãos estão afetados nas duas pessoas aparentadas. Para a maioria dos distúrbios pleiotrópicos, a conexão entre as várias manifestações não é nem óbvia nem bem compreendida.

Algumas das dificuldades em compreender a herança de um fenótipo de doença nas famílias são demonstradas pela doença autossômica dominante **neurofibromatose** (NF1). A NF1 é um distúrbio comum do sistema nervoso, mostrado em uma de suas apresentações clínicas típicas na Fig. 5.8. A NF1 é caracterizada (1) pelo crescimento de múltiplos tumores carnosos benignos, neurofibromas, na pele; (2) pela presença de múltiplas lesões pigmentadas, achatadas e irregulares na pele, conhecidas como manchas *café-au-lait*; (3) pelo crescimento de pequenos tumores benignos (hamartomas) na íris do olho, chamados de nódulos de Lisch; e (4) com menos freqüência, por retardo mental, tumores do sistema nervoso central, neurofibromas plexiformes difusos e o desenvolvimento de câncer do sistema nervoso ou músculo.

A NF1 foi inicial e completamente descrita pelo médico Von Recklinghausen em 1882, mas é provável que a doença já fosse conhecida há muito tempo. Embora os heterozigotos adultos quase sempre demonstrem algum sinal da doença (a penetrância é, portanto, dita como sendo de 100% nos adultos), alguns podem ter apenas as manchas *café-au-lait*, sardas nas axilas e nódulos de Lisch, enquanto outros podem ter tumores benignos ameaçadores da vida envolvendo a coluna dorsal ou sarcomas malignos em uma extremidade. Assim, com freqüência há uma grande variabilidade na expressão da doença; mesmo dentro de uma família, alguns indivíduos são gravemente afetados e outros, apenas de forma branda. O diagnóstico é ainda mais complicado em crianças, porque os sinais só se desenvolvem com o tempo durante a infância. Por exemplo, no período neonatal, menos da metade de todos os neonatos afetados apresentam os sinais mais sutis da doença, um aumento da incidência de manchas *café-au-lait*. A penetrância, portanto, depende da idade. Aproximadamente metade dos casos de NF1 resulta de uma mutação nova, e não de uma herdada. Na família mostrada na Fig. 5.9, o probando (indicado por uma seta) parece ter um gene mutante novo, pois seus genitores e seus avós não são afetados.

O principal problema na consulta genética das famílias de pacientes com NF1 é decidir entre duas possibilidades iguais: a doença nesta família é causada por uma mutação nova ou o paciente herdou uma forma clinicamente significativa do distúrbio de um genitor no qual o gene está presente, mas só se expressa de forma branda? Se o paciente tiver herdado o defeito, o risco de que qualquer um de seus irmãos também herde será de 50%, mas se a criança tiver um gene mutante novo, haverá um risco muito pequeno de que qualquer irmão seja afetado. Significativamente, em ambos os casos, o risco do paciente transmitir o gene para alguém da sua prole é de 50%. A imprevisibilidade da gravidade das manifestações da NF1, uma característica de muitos distúrbios autossômicos dominantes, é uma complicação adicional da consulta genética. Em vista destas incertezas, é importante que as famílias dos pacientes com NF1 saibam que o dis-

Fig. 5.8 Neurofibromatose tipo 1: manchas *café-au-lait*, hiperpigmentadas na pele, são um sinal diagnóstico útil nos membros familiares que de outro modo parecem não-afetados. A maioria dos pacientes tem seis ou mais pontos com pelo menos 15 mm de diâmetro, em geral no tronco. (Foto por cortesia de Rosanna Weksberg, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

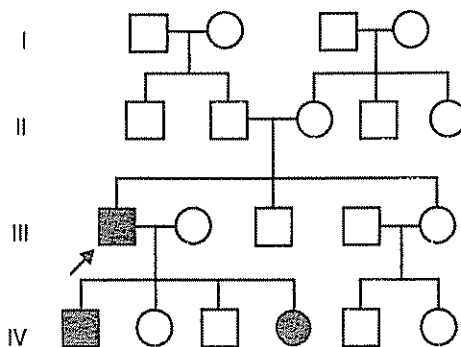



Fig. 5.9 Heredograma de uma família com neurofibromatose tipo 1, originada aparentemente de uma nova mutação no probando (*seta*).

túrbio pode ser detectado antes do aparecimento dos sintomas e mesmo no período pré-natal por análise genética molecular (ver Cap. 18). Infelizmente, não há modo de prever a grande proporção de casos que são causados por mutação nova.

Um outro exemplo de uma malformação autossômica dominante com penetrância reduzida é a **deformidade da mão dividida** ou malformação em garra de lagosta, um tipo de ectrodactilia (Fig. 5.10). A malformação origina-se na sexta ou sétima semana de desenvolvimento, quando as mãos e os pés estão se formando. A falta de penetrância nos heredogramas de malformação da mão dividida pode levar a um aparente pulo de gerações, o que complica a consulta genética, pois a pessoa em risco com mãos normais pode, entretanto, possuir o gene para a condição e, assim, ser capaz de ter filhos afetados.

A Fig. 5.11 é um heredograma de deformidade de mão dividida no qual a pessoa mostrada pela seta é o consulente (a pessoa que procura a consulta genética). Sua mãe é uma portadora não-penetrante da mutação da mão dividida. A revisão da literatura sobre a deformidade da mão dividida sugere que o distúrbio tem cerca de 70% de penetrância (isto é, apenas 70% das pessoas que têm o gene exibem o defeito). Usando esta informação na análise bayesiana, um método matemático para determinar as probabilidades condicionais nos heredogramas (ver uma discussão maior no Cap. 19), podemos calcular o risco de que o consulente possa ter um filho com a anormalidade.

Homozigotos para Características Autossômicas Dominantes

Na prática médica, os homozigotos para fenótipos dominantes raros geralmente não são vistos, pois as reproduções que podem gerar prole homozigota são raras. Mais uma vez representando o alelo mutante como *A* e o alelo normal com *a*, os genitores de um homozigoto podem, teoricamente, ser *A/a* × *A/a*, *A/A* × *A/a*, ou *A/A* × *A/A*, ou o paciente pode, em casos muito raros, ter recebido uma nova mutação de um genitor geneticamente não-afetado. Em termos práticos, entretanto, apenas a reprodução de dois heterozigotos precisa ser considerada, e mesmo isto é um evento incomum para a maioria das condições autossômicas dominantes.

Prole da Reprodução *A/a* × *A/a*

		Genitor Afetado *A/a*	
		A	*a*
Genitor Afetado *A/a*	*A*	*A/A* Homozigoto Afetado	*A/a* Afetado
	a	*A/a* Afetado	*a/a* Normal

Clinicamente, a distinção entre heterozigotos afetados e homozigotos pode ser feita com considerável certeza em muitos casos porque os distúrbios autossômicos dominantes em geral são muito mais graves nos homozigotos que nos heterozigotos. A Fig. 5.12 mostra uma criança com a forma típica heterozigota da **acondroplasia**, um distúrbio esquelético de nanismo dos membros curtos e cabeça de tamanho grande. A maioria dos indivíduos acondroplásicos tem inteligência normal e leva uma vida normal dentro de suas possibilidades físicas. É compreensível que os casamentos entre dois indivíduos acondroplásicos não sejam comuns. Um filho homozigoto de dois heterozigotos em geral é reconhecível apenas em bases clínicas. Os pacientes acondroplásicos homozigotos são afetados com muito mais gravidade que os heterozigotos e é comum que não sobrevivam ao início da lactância.

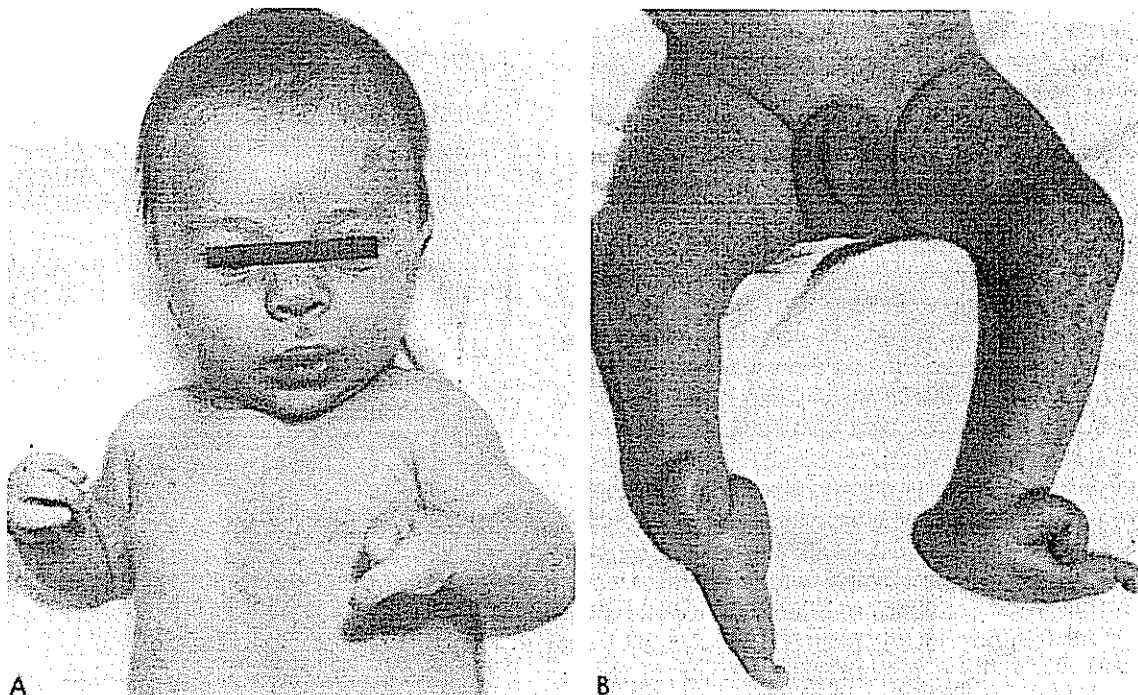



Fig. 5.10 Deformidade da mão dividida, uma característica autossômica dominante envolvendo as mãos e os pés de um menino de 3 meses. A, parte superior do corpo; B, parte inferior do corpo. (De Kelikian H [1974] Congenital deformities of the hand and forearm. WB Saunders, Philadelphia.)

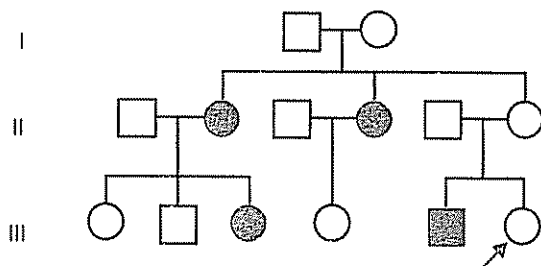



Fig. 5.11 Heredograma da deformidade da mão dividida demonstrando falta de penetrância na mãe do consulente, o qual é indicado por uma seta A penetrância reduzida deve ser levada em conta na consulta genética

Um outro exemplo é a **hipercolesterolemia familiar** (ver Cap. 12), um distúrbio autossômico dominante que leva a uma doença coronariana prematura, na qual os raros pacientes homozigotos têm uma doença muito mais grave, com uma expectativa de vida muito mais curta, que os heterozigotos, relativamente comuns (Fig. 5.13).

De fato, em quase todos os exemplos relatados, a homozigose para um alelo defeituoso resulta em um fenótipo mais gravemente anormal que a heterozigose. Uma exceção bem conhecida é a **doença de Huntington** (HD), uma doença neurodegenerativa caracterizada por demência progressiva e movimentos anormais (ver Cap. 12) Os homozigotos HD podem ser distintos dos heterozigotos, muito mais comuns, por análise molecular do gene mutante, e a expressão clínica parece ser a mesma em ambos os genótipos.

Fenótipo Limitado ao Sexo na Doença Autossômica

Como já foi discutido para as condições autossômicas recessivas, os fenótipos autossômicos dominantes podem demonstrar uma proporção sexual que difere significativamente de 1:1. A extrema divergência de proporção sexual é vista nos fenótipos limitados ao sexo, nos quais o defeito é transmitido autossomicamente, mas se expressa apenas em um sexo. Um exemplo é a **puberdade precoce limitada ao sexo** (testotoxicose familiar), um distúrbio autossômico dominante no qual os meninos afetados desenvolvem características sexuais secundárias e têm um surto de crescimento adolescente por volta dos 4 anos de idade (Fig. 5.14). Em algumas famílias, o defeito foi relacionado a uma mutação no gene que codifica o receptor de hormônio luteinizante que ativa constitutivamente a ação sinalizadora dos receptores mesmo na ausência do hormônio. O defeito é não-penetrante em mulheres heterozigotas. A Fig. 5.15, parte de um heredograma muito maior, mostra que, embora a doença possa ser transmitida diretamente por mulheres não-afetadas, também pode ser transmitida diretamente de pai para filho, mostrando que é autossômica e não-ligada ao X.

Os homens com puberdade precoce têm fertilidade normal e são conhecidos vários heredogramas com muitas gerações. Para distúrbios nos quais os homens afetados não se reproduzem, entretanto, nem sempre é fácil distinguir a herança autossômica limitada ao sexo da ligada ao X, pois a evidência crucial, a ausência de transmissão de homem para homem, não pode ser observada. Outras linhas de evidência, especialmente o mapeamento gênico para verificar se o gene responsável está mapeado no cromossomo X ou em um autossomo (ver Cap. 8), podem determinar o padrão de herança e o conseqüente risco de recorrência.

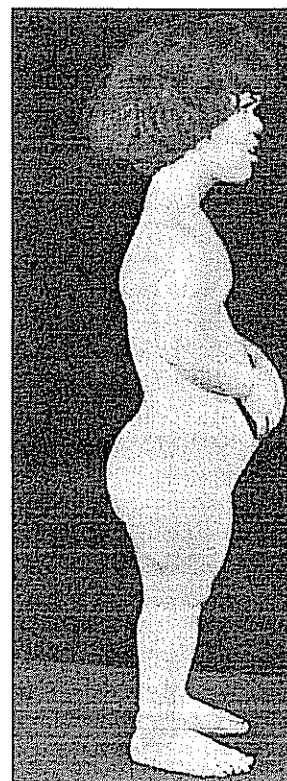



Fig. 5.12 Acondroplasia, um distúrbio autossômico dominante que em geral ocorre como uma mutação nova. Notar a baixa estatura, os membros curtos, a cabeça grande, a ponte nasal baixa, a cabeça proeminente e a lordose lombar (De Tachdjian M O [1972] Pediatric Orthopedics, vol I WB Saunders, Philadelphia, p 284.)

HERANÇA LIGADA AO X

Os cromossomos X e Y, que são responsáveis pela determinação do sexo (ver Cap. 10), são distribuídos de modo desigual para homens e mulheres nas famílias. Por este motivo, os fenótipos determinados pelos genes do X têm uma distribuição sexual característica e um padrão de herança que em geral é fácil de identificar. Cerca de 500 genes já foram mapeados no cromossomo X, 70% dos quais associados a fenótipos de doenças.

Considere um gene mutante ligado ao X, X_h (por exemplo, a hemofilia A causada por uma mutação no gene para o fator VIII de coagulação), em comparação com um alelo normal, X_H. Como os homens têm um cromossomo X mas as mulheres têm dois, existem dois genótipos possíveis nos homens, mas três nas mulheres. Os homens são hemizogotos com relação aos genes ligados ao X, enquanto as mulheres podem ser homozigotas para qualquer um dos alelos ou podem ser heterozigotas.

	Genótipos	Fenótipos
Homens	X_H	Não-afetado
	X_h	Afetado
Mulheres	X_H/X_H	Homozigota não-afetada
	X_H/X_h	Heterozigotas
	X_h/X_h	Homozigota afetada

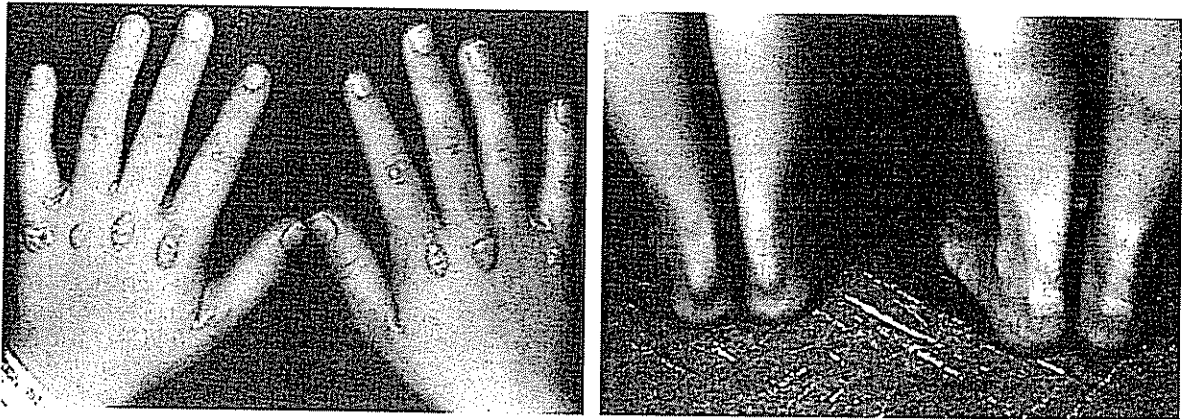



Fig. 5.13 Comparação dos graves sintomas da hipercolesterolemia familiar (FH): xantomas cutâneos em um homozigoto para FH (*esquerda*) e xantomas tendinosos em heterozigotos para FH (*direita*). (Fotos por cortesia de J. L. Goldstein, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas.)

Características da Herança Autossômica Dominante

1. O fenótipo em geral aparece em todas as gerações, com as pessoas afetadas tendo um genitor afetado.

   Exceções, ou aparentes exceções, a esta regra em genética clínica: (1) casos que surgiram por mutação nova em um gameta de um genitor fenotipicamente normal; (2) casos nos quais o distúrbio não se expressa (não-penetrante) ou é expresso apenas levemente em uma pessoa que herdou o gene responsável.
2. Qualquer filho de um genitor afetado tem um risco de 50% de herdar a característica.

   Isto é verdade para a maioria das famílias, nas quais o outro genitor é fenotipicamente normal. Como em termos estatísticos cada membro da família é o resultado de um "evento independente", grandes desvios da esperada proporção 1:1 podem ocorrer por acaso em uma única família.
3. Membros da família fenotipicamente normais não transmitem o fenótipo para seus filhos.

   A falta de penetrância ou uma expressividade muito baixa de uma condição pode levar a aparentes exceções a esta regra.
4. Homens e mulheres têm igual probabilidade de transmitir o fenótipo para seus filhos de ambos os sexos. Pode ocorrer a transmissão de homem para homem, e os homens podem ter filhas não-afetadas.
5. Uma proporção significativa de casos isolados deve-se a mutações novas. Quanto menor é a adaptabilidade, maior é a proporção devida a uma mutação nova.

Inativação do X, Compensação de Dose, e Expressão de Genes Ligados ao X

Hipótese de Lyon

Embora os homens tenham apenas uma cópia, ou "dose", de cada gene ligado ao X, enquanto as mulheres têm duas, a quantidade de produtos formados por um único alelo no homem ou por um par de alelos na mulher geralmente é equivalente. O mecanismo pelo qual esta "compensação de dose" é obtida pode ser explicado pelo princípio da inativação do X (Fig. 5.16), que em geral é chamado de **hipótese de Lyon**, porque foi originalmente detalhado pela geneticista de camundongo Mary Lyon. Em resumo, o princípio tem três pontos:

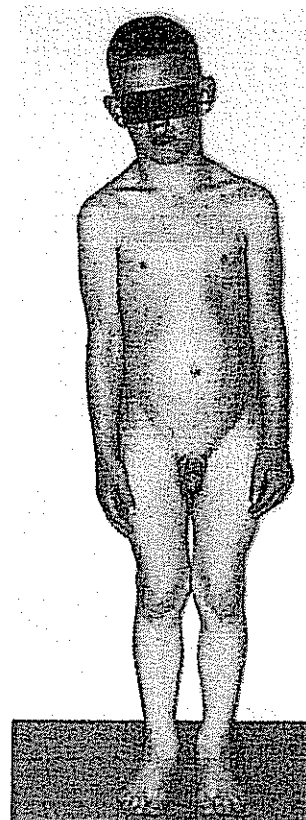



Fig. 5.14 Puberdade precoce limitada ao homem (testotoxicose familiar), um distúrbio autossômico dominante expresso exclusivamente nos homens. Esta criança, de 4,9 anos, tem 120 cm de altura (acima do 97° percentil para sua idade). Note a massa muscular e o desenvolvimento precoce da genitália externa. A fusão epifiseal ocorre em idade precoce e as pessoas afetadas são relativamente baixas quando adultas.

Fig. 5.15 Padrão de heredograma de puberdade precoce limitada ao homem na família da criança mostrada na Fig 5 14 Este distúrbio autossômico dominante pode ser transmitido por homens afetados ou por mulheres portadoras não-afetadas A transmissão de homem para homem mostra que a herança é autossômica e não ligada ao X Como a característica é transmitida por mulheres portadoras não-afetadas, não pode ser ligada ao Y

1. Nas células somáticas das fêmeas dos mamíferos, apenas um cromossomo X é transcricionalmente ativo. O segundo X é heterocromático e inativo e surge nas células interfásicas como cromatina sexual, o corpúsculo de Barr.
2. A inativação ocorre cedo na vida embrionária, começando logo após a fertilização, mas não é completa na massa celular interna, que forma o embrião, até cerca do final da primeira semana de desenvolvimento. Neste estágio do desenvolvimento, a implantação placentária está ocorrendo, há diferenciação do trofoblasto em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto, e o epiblasto, que consiste em talvez apenas 100 células, sofre gastrulação (ver Cap. 17).
3. Em qualquer célula somática feminina, o X inativo pode ser o X paterno ou materno (X^p ou X^m). É inteiramente uma questão de acaso qual do par ficará inativado em qualquer célula. Depois que um cromossomo X ficou inativo em uma célula, entretanto, todas as células descendentes desta terão o mesmo X inativo. Em outras palavras, a inativação é determinada aleatoriamente, mas quando ocorre, a decisão é permanente.

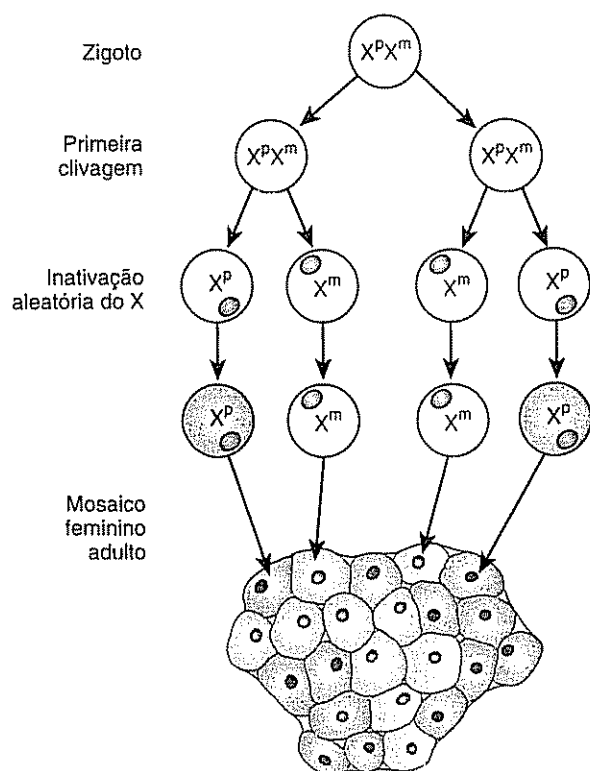



Fig. 5.16 A hipótese de Lyon da inativação aleatória do cromossomo X nas células somáticas femininas X^p = cromossomo X herdado paternamente; X^m = cromossomo X herdado maternamente Os ovais cinza ou vermelhos representam os corpúsculos de Barr formados pelo cromossomo X paterno ou materno inativado, respectivamente. Os tecidos adultos (*embaixo*) são um mosaico de populações clonais que expressam alelos de X^p ou X^m. (Modificado de Rosenberg L E [1980] Inborn errors of metabolism *In* Bondy P K, Rosenberg L E [eds] Metabolic control and disease. 8.ª ed WB Saunders, Philadelphia. p 73-102)

Nesta seção, descreveremos três conseqüências da inativação do X que são significativas tanto genética quanto clinicamente: compensação de dose, variabilidade de expressão em mulheres heterozigotas e mosaicismo. As implicações da inativação do X para a citogenética clínica serão discutidas em maiores detalhes no Cap. 10.

Compensação de Dose

A inativação do X dá uma explicação para a compensação de dose, pois o cromossomo X inativo é quase totalmente silenciado e, com algumas exceções, seus genes parecem não ser transcritos. As características básicas da hipótese de Lyon foram firmemente estabelecidas. Os detalhes de como isto ocorre não são totalmente conhecidos. Nossa compreensão atual sobre o mecanismo da inativação do X está apresentada no Cap. 10.

Escape da Inativação do X

Embora nas células somáticas femininas a maior parte do X seja inativada, várias regiões do braço curto e pelo menos uma região do braço longo contêm genes que escapam da inativação e continuam a se expressar em ambos os cromossomos X nas mulheres. Os genes ligados ao X que escapam da inativação enquadram-se em três classes. Uma classe são os genes situados na **região pseudo-autossômica**, nos segmentos distais dos braços longo e curto do X, onde existem seqüências correspondentes ao cromossomo Y, por meio das quais o X e o Y pareiam-se na meiose e trocam material por crossing over. Os genes no segmento pseudo-autossômico permanecem ativos, e tanto as mulheres (duas cópias do X) quanto os homens (um X e um Y) têm duas doses expressas de tais genes. Os alelos para genes na região pseudo-autossômica podem apresentar transmissão de homem para homem por crossing over entre X e Y, que podem ser passados para

a prole masculina e, assim, mimetizar uma herança autossômica. Uma segunda classe de genes ligados ao X que escapa da inativação está situada fora da região pseudo-autossômica no braço curto e no braço longo. Estes genes têm cópias correlatas no cromossomo Y e, assim, tanto os homens quanto as mulheres têm duas cópias ativas destes genes. As cópias ligadas ao X destes genes não apresentam herança pseudo-autossômica porque não participam do crossing com o cromossomo Y na meiose masculina. Uma terceira classe de genes que também escapa da inativação está situada fora da região pseudo-autossômica do cromossomo X e *não* tem uma cópia no Y. Por exemplo, o gene para esteróide sulfatase (deficiência que causa uma forma ligada ao X da doença de pele ictiose) não está na região pseudo-autossômica do cromossomo X, mas sim próxima a ela, e permanece parcialmente ativa, mesmo no X inativo. Como não existe cópia ativa no cromossomo Y nos seres humanos, o número de cópias e os níveis de expressão são maiores nas mulheres que nos homens.

A relevância clínica da maioria dos genes que escapa da inativação é incerta, mas pelo menos um gene não-inativado, de esteróide sulfatase, um distúrbio clínico ligado ao X, está associado com a perda de função deste gene. Estes genes também são candidatos a explicar sintomas clínicos em casos de anomalias numéricas do cromossomo X, tais como a síndrome de Turner 45,X (ver Cap. 10), porque seus produtos gênicos não apresentariam a dosagem apropriada em comparação com as mulheres normais, portadoras de dois cromossomos X normais.

Expressividade Variável de Genes Ligados ao X em Heterozigotas

Como a inativação é aleatória mas é estabelecida em um estágio do desenvolvimento embrionário em que o embrião tem menos de 100 células, a fração de células nas mulheres portadoras nas quais o alelo normal ou o mutante permanece ativo pode ser bem variável. Como resultado, a variação clínica na expressão dos distúrbios ligados ao X é vista comumente em heterozigotas e pode ser extrema, indo desde absolutamente normal até totalmente manifestante do defeito, com todas as gradações intermediárias. Uma **heterozigota manifestante**, na qual o alelo deletério está situado no X ativo e o alelo normal no X inativo em todas as células ou na maioria delas, é um exemplo extremo de inativação do X altamente desbalanceada ou "desviada". Heterozigotas manifestantes têm sido descritas para muitos distúrbios ligados ao X, incluindo o daltonismo, a hemofilia A (hemofilia clássica, por deficiência do fator VIII), a hemofilia B (doença de Christmas, deficiência do fator IX), a distrofia muscular Duchenne (DMD), a síndrome de Wiskott-Aldrich (uma imunodeficiência ligada ao X) e vários outros distúrbios oculares ligados ao X.

Além das heterozigotas manifestantes, o padrão oposto de **inativação desbalanceada** (isto é, com o alelo mutante preferencialmente no X inativo em alguns ou em todos os tecidos da mulher heterozigota) também pode ocorrer e é característico de vários distúrbios ligados ao X. Em geral, a inativação desbalanceada deste tipo é vista em heterozigotas assintomáticas e é tida como refletindo a sobrevida de uma célula ou a desvantagem proliferativa das células que originalmente tinham o alelo mutante no X ativo (ver Cap. 10). Os padrões de inativação desbalanceada em tecidos relevantes têm sido usados para diagnosticar o estado portador para algumas condições ligadas ao X, incluindo várias formas de retardo mental ligadas ao X, algumas imunodeficiências ligadas ao X (ver Cap. 14), disceratose congênita (uma forma ligada ao X de doença de pele e insuficiência de medula óssea) e incontinência pigmentar (uma condição ligada ao X que afeta a pele e os dentes).

Mosaicismo Funcional Resultante de Inativação do X

As mulheres têm duas populações de células, nas quais um ou o outro cromossomo X é o ativo (ver Fig. 5.16). Em outras palavras, as mulheres são mosaicos com relação aos seus genes ligados ao X. O mosaicismo nas mulheres é prontamente detectado para alguns distúrbios. Por exemplo, na DMD, as mulheres portadoras exibem uma expressão típica de mosaicismo, permitindo que as mulheres sejam identificadas pela imunocoloração de distrofina (Fig. 5.17). Além disso, a heterozigose para vários distúrbios ligados ao X pode ser demonstrada experimentalmente por cultura de células únicas para criar clones, que podem então ser analisados para mostrar que alguns clones têm um X paterno ativo, enquanto outros têm um X materno ativo.

A inativação do X contribui para uma importante diferença entre a herança autossômica e a herança ligada ao X. Nas mulheres, como nos homens, há apenas um X totalmente funcional em qualquer célula. Conseqüentemente, embora os padrões ligados ao X "dominantes" e "recessivos" de herança sejam distintos com base no fenótipo de mulheres heterozigotas, a distinção desaparece na prática. Esta dificuldade ocorre porque em uma mulher heterozigota para um distúrbio dominante ou um recessivo, o alelo mutante é o único alelo funcional em cerca de metade (mas, às vezes, mais ou menos que a metade) de suas células somáticas. Nos homens, o alelo herdado é inevitavelmente expresso, seja sua expressão nos heterozigotos dominante ou recessiva. Alguns geneticistas médicos preferem não classificar os fenótipos ligados ao X como dominantes ou recessivos, mas outros acreditam que a distinção é útil porque alguns fenótipos ligados ao X são consistentemente expressos em portadoras (dominantes), enquanto outros em geral são não expressos nas portadoras (recessivos), a menos que exista um padrão de inativação altamente desbalanceado. Na discussão que se segue, a dominância e recessividade serão examinadas separadamente.

Herança Recessiva Ligada ao X

A herança de fenótipos recessivos ligados ao X segue um padrão bem definido e facilmente reconhecível (Fig. 5.18). Uma mutação ligada ao X é tipicamente expressa em termos fenotípicos em todos os homens que a recebem, mas apenas nas mulheres que são homozigotas para a mutação. Em conseqüência, os distúrbios recessivos ligados ao X em geral são restritos aos homens e, com exceção das raras heterozigotas manifestantes já discutidas, dificilmente são vistos entre as mulheres.

A **hemofilia A** é um distúrbio clássico no qual o sangue não coagula normalmente em função de uma deficiência do fator VIII, uma proteína da cascata de coagulação. A natureza hereditária da hemofilia e mesmo seu padrão de transmissão já são reconhecidos há muito tempo, e a condição tornou-se conhecida como "hemofilia real" por causa de sua ocorrência entre os descendentes da rainha Victoria da Inglaterra, que era portadora.

Como na discussão anterior, X_h representa o alelo do fator VIII mutante causador da hemofilia A e X_H representa o alelo normal. Se um hemofílico se casar com uma mulher normal, todos os filhos receberão o cromossomo Y de seu pai e um X materno, não sendo

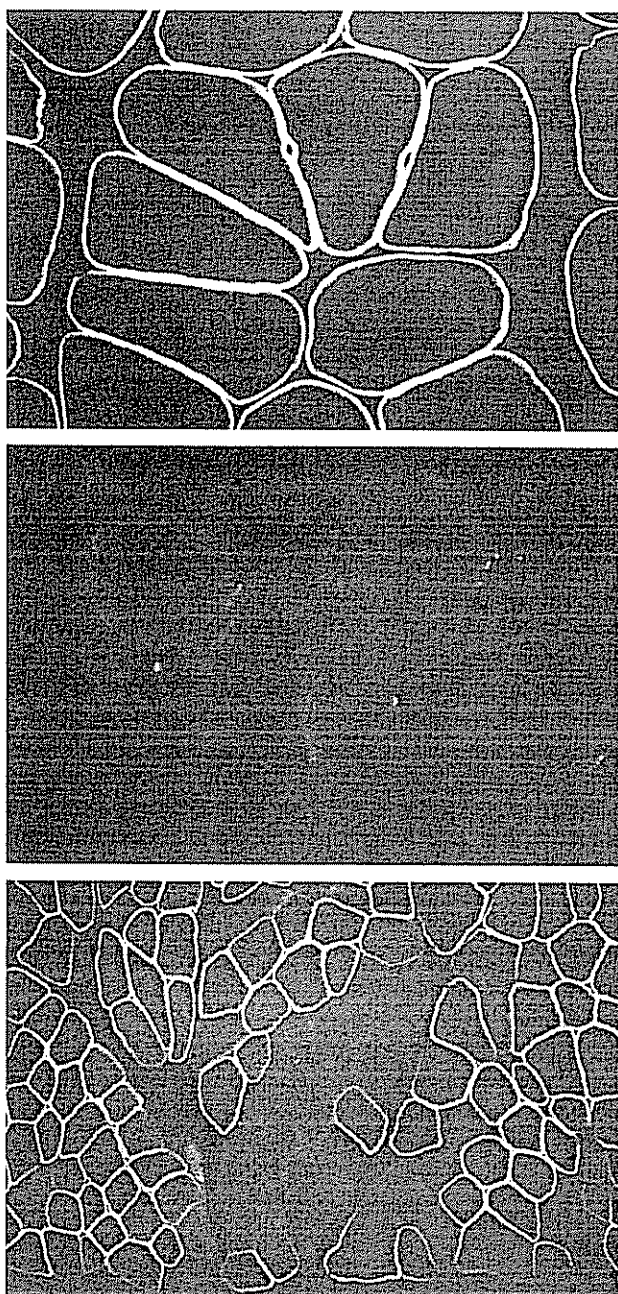



Fig. 5.17 Imunocoloração para distrofina em amostras de músculo (*em cima*) de uma mulher normal (× 480). (*meio*) de um homem com distrofia muscular Duchenne (× 480) e (*embaixo*) de uma mulher portadora (× 240) O músculo dos pacientes com DMD não tem coloração de distrofina O músculo das portadoras de DMD exibe tanto manchas positivas quanto negativas de imunocoloração de distrofina. refletindo a inativação do X (Fotos por cortesia de K Arahata. National Institute of Neuroscience. Tokyo)

afetados, mas todas as filhas receberão o cromossomo X paterno com seu alelo de hemofilia e serão portadoras obrigatórias.

Homem Afetado × Mulher Normal: $X_h/Y \times X_H/X_H$

	X_H	X_H	
X_h	X_H/X_h	X_H/X_h	Filhas: TODAS portadoras
Y	X_H/Y	X_H/Y	Filhos: TODOS não-afetados

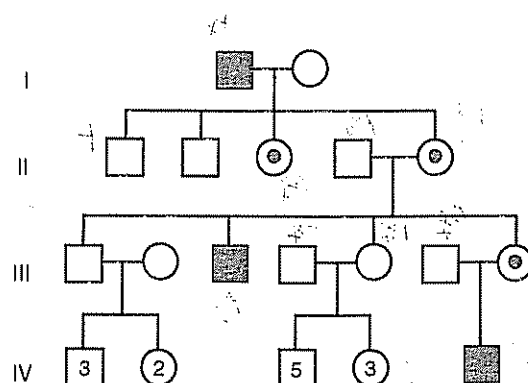



Fig. 5.18 Padrão de heredograma mostrando um distúrbio recessivo ligado ao X tal como a hemofilia A. transmitido a partir de um homem afetado através das mulheres para um neto afetado e um bisneto afetado

Agora suponha que uma filha de um homem afetado reproduza-se com um homem não-afetado São possíveis quatro genótipos na prole, com iguais probabilidades.

Homem Normal × Mulher Portadora: $X_H/Y \times X_H/X_h$

	X_H	X_h	
X_H	X_H/X_H	X_H/X_h	Filhas: 1/2 normais, 1/2 portadoras
Y	X_H/Y	X_h/Y	Filhos: 1/2 normais, 1/2 afetados

A hemofilia de um avô afetado, que não aparece em nenhum de seus filhos, tem uma chance de 50% de aparecer em qualquer filho de suas filhas. Entretanto, não reaparecerá entre os descendentes de seus filhos.

Uma filha de uma portadora tem uma chance de 50% de ser portadora (ver Fig. 5.18). Por acaso, um alelo recessivo ligado ao X pode ser transmitido sem ser detectado por uma série de mulheres portadoras antes de se expressar em um descendente masculino.

Mulheres Homozigotas Afetadas

Um gene para um distúrbio ligado ao X ocasionalmente está presente tanto em um pai quanto uma mãe portadora, e a prole feminina pode então ser homozigota afetada, como mostra o heredograma de daltonismo ligado ao X, um distúrbio relativamente comum. A maioria das doenças ligadas ao X, entretanto, é tão rara que é muito incomum que uma mulher seja homozigota, a menos que seus pais sejam consangüíneos (Fig. 5.19).

Homem Afetado × Mulher Portadora: $X_h/Y \times X_H/X_h$

	X_H	X_h	
X_h	X_H/X_h	X_h/X_h	Filhas: 1/2 portadoras, 1/2 afetadas
Y	X_H/Y	X_h/Y	Filhos: 1/2 normais, 1/2 afetados

Mutação Nova em Distúrbios Ligados ao X

Nos homens, os genes para distúrbios ligados ao X são expostos à seleção. A seleção é completa para alguns distúrbios, parcial para outros e ausente para outros ainda, dependendo da adaptabilidade do genótipo. Os hemofílicos têm apenas cerca de 70% da prole que os homens não-afetados. Isto é, a adaptabilidade dos homens afetados é de cerca de 0,70. A seleção contra os alelos mutantes é mais acentuada para os distúrbios ligados ao X, tais como a DMD, uma doença do músculo que afeta meninos pequenos (ver Cap. 12). O distúrbio em geral é aparente na época em que a criança começa a andar e progride inexoravelmente, de modo que a criança é confinada a uma cadeira de rodas por volta dos 10 anos e, em geral, não sobrevive até os 20 anos. Embora a situação possa mudar em conseqüência dos avanços nas pesquisas destinadas à terapia dos meninos afetados, a DMD é dita um **letal genético**, pois os homens afetados não se reproduzem. Ela pode, é lógico, ser transmitida por mulheres portadoras, que raramente apresentam alguma manifestação desta doença.

Fig. 5.19 Consangüinidade em um heredograma recessivo ligado ao X para daltonismo verde-vermelho, resultando em uma mulher homozigota afetada

Características da Herança Recessiva Ligada ao X

1. A incidência da característica é mais alta nos homens que nas mulheres.
2. As mulheres heterozigotas em geral não são afetadas, mas algumas podem expressar a condição com gravidade variável, determinada pelo padrão de inativação do X.
3. O gene responsável pela condição é transmitido por um homem afetado para todas as suas filhas. Qualquer filho de suas filhas tem um risco de 50% de herdá-lo.
4. O gene em geral nunca é transmitido diretamente do pai para o filho, mas é transmitido por um homem afetado para todas as suas filhas.
5. O gene pode ser transmitido por uma série de mulheres portadoras. Caso isso ocorra, os homens afetados em uma família são relacionados através das mulheres.
6. Uma proporção significativa de casos isolados deve-se à mutação nova.

As novas mutações constituem uma fração significativa de casos isolados de muitas doenças ligadas ao X. Quando os pacientes são afetados por uma doença ligada ao X muito grave, tal como a DMD, eles não podem se reproduzir (a seleção é completa) e, portanto, os alelos mutantes que eles possuem são perdidos da população. Como a incidência de DMD não está mudando, os alelos mutantes perdidos pela não-reprodução dos homens afetados têm que ser continuamente substituídos por mutações novas. Para a hemofilia, na qual a reprodução é diminuída mas não eliminada, uma fração proporcionalmente menor de casos será causada por mutações novas. O equilíbrio entre as mutações novas e a seleção será mais bem discutido no Cap. 7.

Herança Dominante Ligada ao X

Um fenótipo ligado ao X é descrito como dominante caso se expresse regularmente nos heterozigotos. A característica distintiva de um heredograma dominante ligado ao X totalmente penetrante (Fig. 5.20) é que *todas* as filhas e *nenhum* dos filhos de homens afetados são afetados. Se alguma filha não for afetada ou algum filho for afetado, a herança deve ser autossômica, não-ligada ao X. O padrão de herança através das mulheres não é diferente do padrão autossômico dominante. Como as mulheres têm um par de cromossomos X como têm pares de autossomos, cada filho de uma mulher afetada tem uma chance de 50% de herdar a característica, independente do sexo. Como regra geral, os fenótipos raros dominantes ligados ao X são cerca de duas vezes mais comuns nas mulheres que nos homens, embora a expressão em geral seja mais branda nas mulheres, que são quase sempre heterozigotas.

Apenas alguns distúrbios genéticos são classificados como dominantes ligados ao X. Um exemplo é o **raquitismo hipofosfatêmico** (também chamado de raquitismo resistente à vitamina D), no qual a habilidade dos túbulos renais de reabsorver o fosfato filtrado é prejudicada. Este distúrbio ajusta-se ao critério de um distúrbio dominante ligado ao X, pois, embora ambos os sexos sejam afetados, o nível de fosfato sérico é menos diminuído e o raquitismo é menos grave nas mulheres heterozigotas que nos homens afetados. O produto gênico defeituoso parece ser um membro de uma família de endopeptidases que ativam ou degradam uma variedade de hormônios peptídicos. O mecanismo patogênico pelo qual uma deficiência desta endopeptidase resulta em um distúrbio do metabolismo de fosfato e em raquitismo não é conhecido.

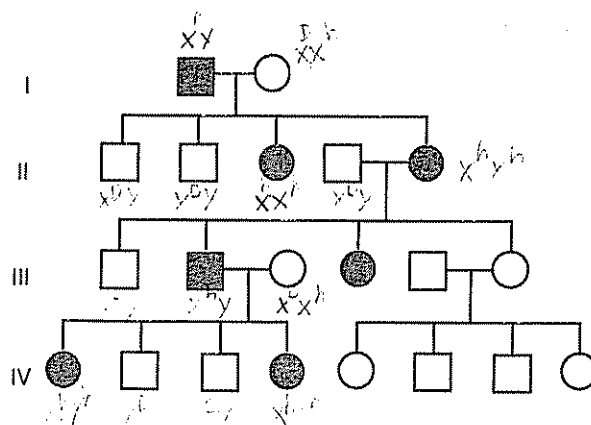



Fig. 5.20 Padrão de heredograma demonstrando herança dominante ligada ao X

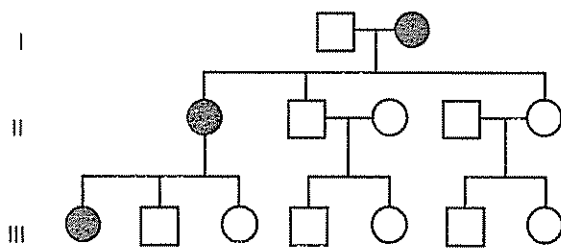



Fig. 5.21 Padrão de heredograma demonstrando um distúrbio dominante ligado ao X. letal em homens durante o período pré-natal

Fig. 5.22 Eritema linear típico e bolhas em uma menina com incontinência pigmentar. À medida que a criança fica mais velha, as lesões da pele tornam-se faixas achatadas e pigmentadas. (Foto por cortesia de Virginia Sybert. University of Washington, Seattle.)

Alguns dos raros defeitos genéticos expressos exclusivamente ou quase exclusivamente nas mulheres parecem ser condições dominantes ligadas ao X que são letais nos homens antes do nascimento. Os heredogramas típicos destas condições mostram a transmissão por mulheres afetadas, que produzem filhas afetadas, filhas normais e filhos normais em proporções iguais (1:1:1) (Fig. 5.21). A **incontinência pigmentar tipo 2** (IP2) (Fig. 5.22) é um distúrbio marcante que atende a todos os critérios de um distúrbio dominante ligado ao X que é letal nos homens (hemizigotos). O distúrbio ocorre exclusivamente nas mulheres. Ele é caracterizado por exantemas da pele que começam na lactância como um padrão de eritema na pele, vesículas e pústulas, que então progridem para espessamento e hiperpigmentação e, por fim, fibrose e adelgaçamento. Microcefalia, retardo mental, dentes pequenos ou ausentes e perda de cabelo também são vistos com freqüência. A hipótese de que a IP2 seja letal nos homens é apoiada pelo fato de que são conhecidos apenas um ou dois homens gravemente afetados, e a proporção de homens para mulheres na prole de mulheres heterozigotas para o distúrbio é de apenas 1:2 em vez da 1:1 esperada. Além disso, as mulheres heterozigotas têm um padrão quase que totalmente não-aleatório de inativação do X, o que pode ser explicado supondo-se que uma mulher heterozigota sobrevive apenas porque o cromossomo X com a mutação responsável pela IP2 está inativo em quase 100% de suas células.

Características da Herança Dominante Ligada ao X

1. Os homens afetados que se reproduzem com mulheres normais não têm filhos afetados nem filhas normais.
2. A prole tanto masculina quanto feminina de mulheres portadoras tem um risco de 50% de herdar o fenótipo. O padrão do heredograma é o mesmo visto com a herança autossômica dominante.
3. Para fenótipos raros, as mulheres afetadas são cerca de duas vezes mais comuns que os homens afetados, mas é típico que as mulheres afetadas tenham uma expressão mais branda (embora variável) do fenótipo

PADRÕES DE HERANÇA PSEUDO-AUTOSSÔMICA

A herança pseudo-autossômica descreve o padrão de herança visto em genes da região pseudo-autossômica dos cromossomos X e Y que pode ser regularmente trocada entre os dois cromossomos sexuais, mimetizando assim uma herança autossômica. A **discondrosteose**, uma displasia esquelética herdada dominantemente, com baixa estatura desproporcional e deformidade do antebraço, é um exemplo de uma condição pseudo-autossômica. Uma prevalência maior da doença foi vista nas mulheres, se comparadas com os homens, sugerindo um distúrbio dominante ligado ao X, mas a presença da transmissão de homem para homem exclui claramente a herança ligada ao X (Fig. 5.23). O gene responsável por esta síndrome de nanismo é um gene pseudo-autossômico que escapa da inativação do X e codifica um fator de transcrição provavelmente envolvido na regulação da estatura. A deleção ou uma mutação deste gene resulta em discondrosteose tanto em homens quanto em mulheres heterozigotas.

PADRÕES ATÍPICOS DE HERANÇA

Como regra geral, os padrões de herança e as proporções de segregação dos distúrbios monogênicos estão de acordo com os princípios da herança mendeliana. Durante o século XX, desde que Garrod e Bateson aplicaram pela primeira vez as leis de Mendel aos erros hereditários do metabolismo, foram observadas poucas exceções à herança mendeliana. Entretanto, o exame atento de alguns distúrbios incomuns e a análise das mutações em detalhe molecular têm mostrado que as exceções à herança mendeliana ocorrem nos distúrbios monogênicos e devem ser consideradas em genética médica. Nesta seção, descreveremos resumidamente situações nas quais a herança de distúrbios monogênicos diverge dos padrões típicos mendelianos.

Padrões Incomuns de Herança Devidos ao *Imprinting* Genômico

Com base nos princípios mendelianos, um alelo mutante de um gene autossômico tem igual probabilidade de ser transmitido por um genitor, de um dos sexos, para uma prole de um dos sexos. De modo similar, uma mulher tem igual probabilidade de transmitir o gene mutado ligado ao X para um filho de um dos sexos. Originalmente, pouca atenção foi dada a se o sexo do genitor tinha algum efeito na *expressão* dos genes que cada genitor transmite. Entretanto, hoje sabemos que em alguns dis-

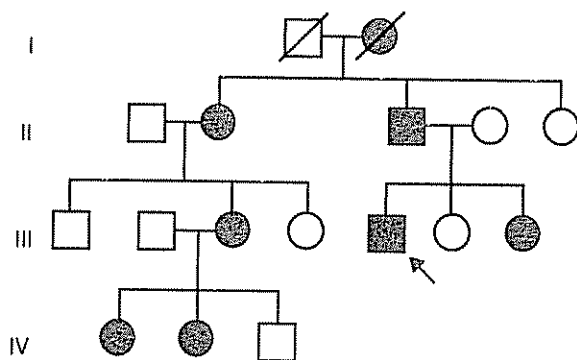



Fig. 5.23 Heredograma mostrando herança de discondrosteose decorrente de mutações em um gene pseudo-autossômico nos cromossomos X e Y. A seta mostra um homem que herdou a característica em seu cromossomo Y de seu pai. Seu pai, entretanto, herdou a característica em seu cromossomo X de sua mãe. (De Shears D. J. *et al.* [1998] Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis. Nat Genet 19:70-73.)

túrbios genéticos a expressão do fenótipo da doença depende de se o alelo mutante foi herdado do pai ou da mãe. As diferenças na expressão gênica entre o alelo herdado da mãe e o alelo herdado do pai resultam de ***imprinting* genômico**. O *imprinting* é causado por uma alteração incompletamente compreendida na cromatina que afeta a expressão de um gene, mas não sua seqüência de DNA. Assim, é uma forma reversível de inativação gênica, mas não é uma mutação.

Um tipo importante de *imprinting* ocorre durante a gametogênese, antes da fertilização, e marca alguns genes como tendo vindo da mãe ou do pai. Após a concepção, o *imprint* suprime a expressão do alelo "imprintado" em alguns ou em todos os tecidos somáticos do embrião e mesmo no período pós-natal, na vida adulta, ao longo de centenas de divisões celulares. Entretanto, o *imprinting* deve ser reversível: um alelo paternamente "imprintado", quando herdado por uma mulher, deve ser convertido em sua linhagem germinativa, de modo que ela então possa transmiti-lo com um *imprint* materno para a sua prole. Similarmente, um alelo maternamente "imprintado", quando herdado por um homem, deve ser convertido em sua linhagem germinativa, de modo que ele possa ser transmitido como paternamente "imprintado" para sua prole (Fig. 5.24). O controle deste processo de conversão parece ser governado por um elemento do DNA chamado de **centro de *imprinting***, situado na própria região "imprintada".

Síndromes de Prader-Willi e Angelman

Talvez os exemplos mais bem estudados do papel do *imprinting* genômico em doenças humanas sejam a **síndrome de Prader-Willi** (PWS) e **síndrome de Angelman** (AS). A PWS é uma síndrome dismórfica relativamente comum, caracterizada por obesidade, hábitos alimentares indiscriminados e excessivos, mãos e pés pequenos, baixa estatura, hipogonadismo e retardo mental (Fig. 5.25). Em cerca de 70% dos casos da síndrome, há uma deleção citogenética (ilustrada no Cap. 9, Fig. 9.5H) envolvendo o braço longo proximal do cromossomo 15 (15q11-q13), ocorrendo no cromossomo 15 herdado do pai do paciente (Quadro 5.3). Assim, os genomas destes pacientes têm a informação genética em 15q11-q13 derivada apenas da mãe. Em contraste, em cerca de 70% dos pacientes com a rara AS, caracterizada por aspecto facial incomum, baixa estatura, grave retardo mental, espasticidade e convulsões (Fig. 5.26), há uma deleção de aproximadamente a mesma região cromossômica, mas no cromossomo 15 herdado da mãe. Os pacientes com AS, portanto, têm a informação genética em 15q11-q13 derivada apenas do pai. Esta circunstância incomum demonstra marcantemente que a origem parental do material genético (neste caso, no cromossomo 15) pode ter um profundo efeito na expressão clínica de um defeito.

Grandes deleções não são a única causa de AS. Em particular, as mutações na cópia materna de um único gene, o gene E6-AP de ubiquitina-proteína ligase, foram vistas causando AS. O gene E6-AP ubiquitina-proteína ligase está situado em 15q11-q13 e expressa-se normalmente apenas pelo alelo materno no sistema nervoso central. As mutações em um único gene "imprintado" ainda não foram encontradas na PWS.

Uma minoria (cerca de 30%) dos pacientes com PWS não tem deleções citogenéticas. Em vez disso, eles têm um par intato do cromossomo 15, ambos herdados da mãe (ver Quadro 5.3). Em contraste, apenas uma pequena minoria dos pacientes com AS (cerca de 3% a 5%) tem dois cromossomos 15 intatos de origem paterna. Esta situação incomum, chamada de **dissomia uniparental** (ver a seção que se segue), confirma que a PWS e a AS resultam da perda da contribuição paterna e materna de genes em 15q11-q13, respectivamente.

Além da deleção cromossômica e da dissomia uniparental, alguns pacientes com PWS e AS parecem ter um defeito no próprio centro de *imprinting* (ver Quadro 5.3). Como resultado, a mudança de *imprinting* de feminino para masculino durante a espermatogênese ou de masculino para feminino durante a ovocitogênese (ver Fig. 5.24) não ocorre. A fertilização por um espermatozóide levando um *imprint* feminino anormalmente persistente produziria uma criança com PWS. A fertilização de um ovócito portador de um *imprint* masculino impropriamente persistente resultaria em AS.

Dissomia Uniparental

A dissomia uniparental é definida como a presença de uma linhagem celular dissômica contendo dois cromossomos, ou partes deles, herdados de um genitor. Se o cromossomo idêntico estiver presente em duplicata, a situação é descrita como uma **isodissomia**. Se ambos os homólogos de um genitor estiverem presentes, a situação é uma **heterodissomia**.

Até quase o final da década de 1980, a dissomia uniparental era desconhecida, mas agora que as técnicas da genética molecular permitem que a fonte parental dos cromossomos seja prontamente identificada, ela foi documentada em vários distúrbios clínicos além da PWS e AS. Por exemplo, dois pacientes com CF e baixa estatura foram descritos com duas cópias idênticas da maioria ou de todo o cromossomo 7 materno. Em ambos os casos, a mãe era portadora de CF, e como a criança recebeu duas cópias maternas do gene CF mutante e nenhuma cópia paterna do gene CF normal, a criança desenvolveu a doença. A falta de crescimento não foi explicada, mas pode estar relacionada com a perda de genes paternamente "imprintados" não-identificados no cromossomo 7. A dissomia uniparental para uma parte do cromossomo 11 (11p15) está implicada na **síndrome de Beckwith-Wiedemann**. As crianças afetadas são grandes ao nascimento e têm língua aumentada, bem como freqüente protrusão do umbigo. Uma grave hipoglicemia é uma complicação que ameaça a vida, da mesma forma que as malignidades dos rins, das

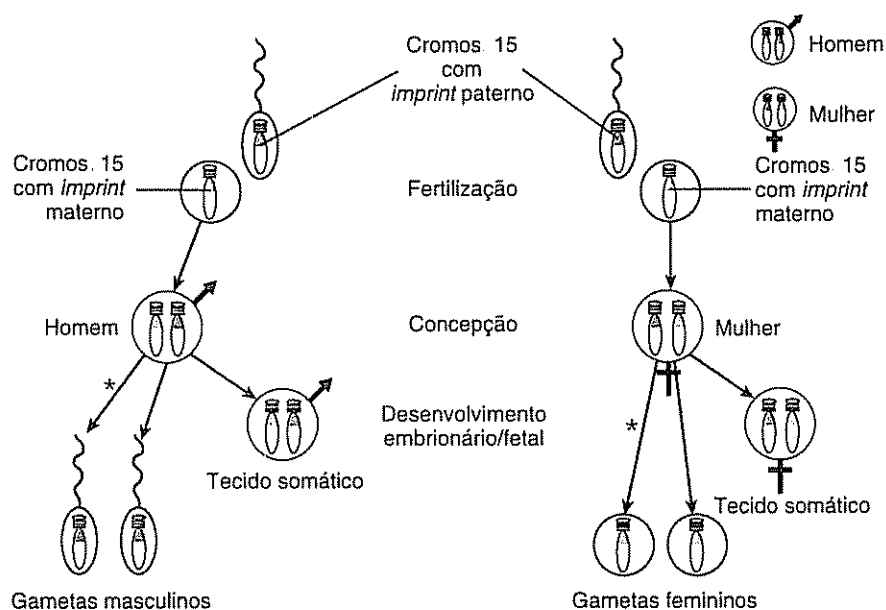



Fig. 5.24 Diagrama da conversão de material e *imprinting* materno e paterno durante a passagem pela linhagem germinativa para fazer gametas masculinos e femininos O apagar do *imprint* uniparental em um cromossomo e a conversão para o *imprint* do outro sexo é marcado por *

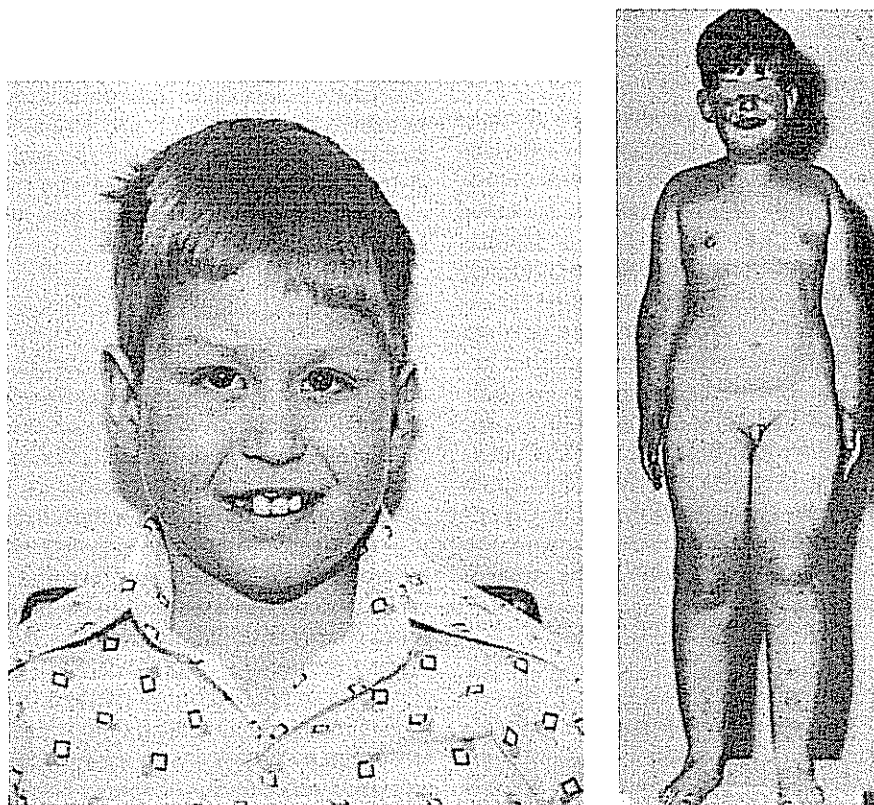



Fig. 5.25 Síndrome de Prader-Willi. *Esquerda*. Face típica de um menino de 9 anos afetado (De Pettigrew A L. Gollin S M, Greenberg F, *et al* [1987] Duplication of proximal 15q as a cause of Prader-Willi syndrome Am J Med Genet 28:791-802 Copyright © 1990 Wiley-Liss. Inc Reimpresso por permissão de John Wiley and Sons. Inc) *Direita*. Obesidade. hipogonadismo e mãos e pés pequenos em um menino de 9.5 anos afetado. que também tem baixa estatura e retardo de desenvolvimento (De Jones K L [1988] Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. 4.ª ed WB Saunders. Philadelphia. p 173)

QUADRO 5-3

Mecanismos Moleculares Causadores das Síndromes de Prader-Willi e Angelman

	Síndrome de Prader-Willi	Síndrome de Angelman
Deleção 15q11-q13	± 70% (paterna)	± 70% (materna)
Dissomia uniparental	± 30% (materna)	de 3% a 5% (paterna)
Mutação monogênica	ND	E6-AP ubiquitina-proteína ligase (de 2% a 4% do total, mas vista só em casos familiares)
Mutação no centro de *imprinting*	1%-2%	7%-9%
Outros	ND	10%-20%

ND = nenhuma detectada

Dados de Jiang Y., Tsai T F., Bressler J., Beaudet A L. (1998) Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. Curr Opin Genet Dev 8:334-342 and Nicholls R D., Saitoh S., Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes Trends Genet 14:194-200

supra-renais e do fígado. A condição resulta de um excesso de contribuição de genes paternos ou perda de maternos, ou ambos, no cromossomo 11p15, incluindo o gene do fator 2 de crescimento similar à insulina A dissomia uniparental também pode envolver os cromossomos sexuais, como mostrou um caso relatado de transmissão de pai para filho de hemofilia A, no qual um menino afetado herdou seus cromossomos X e Y do pai, sem contribuição de cromossomo sexual da mãe.

Embora seja muito cedo para dizer se a dissomia uniparental é uma raridade interessante ou um fenômeno relativamente comum, existem várias regiões no genoma que mostram evidência de *imprinting* genômico (ver Fig. 9.13). Os médicos e consultores genéticos devem ter o *imprinting* em mente como uma possível causa de distúrbios genéticos, especialmente nos casos de distúrbios autossômicos recessivos nos pacientes que têm apenas um genitor portador documentado ou nos casos de distúrbios ligados ao X transmitidos de pai para filho ou expressos sob a forma homozigota nas mulheres.

Mosaicismo

O mosaicismo é definido como a presença em um indivíduo ou em um tecido de pelo menos duas linhagens celulares que diferem geneticamente, mas são derivadas de um único zigoto. Embora em geral pensemos em nós mesmos como sendo compostos de células que possuem exatamente o mesmo complemento de genes e cromossomos, isto, na verdade, é um conceito muito simplificado. Já introduzimos o conceito de mosaicismo devido à inativação do X que gera duas populações diferentes de células somáticas nas mulheres, aquelas em que o X paterno é o cromossomo ativo e aquelas em que o X materno é o cromossomo ativo. De modo mais geral, as mutações que surgem em células únicas na vida pré-natal ou pós-natal podem originar clones de células geneticamente diferentes do zigoto original (Fig. 5.27). O mosaicismo é um fenômeno clinicamente importante nos distúrbios cromossômicos (ver Cap. 9), e a mutação somática é reconhecida como a principal causa de muitos tipos de câncer (ver

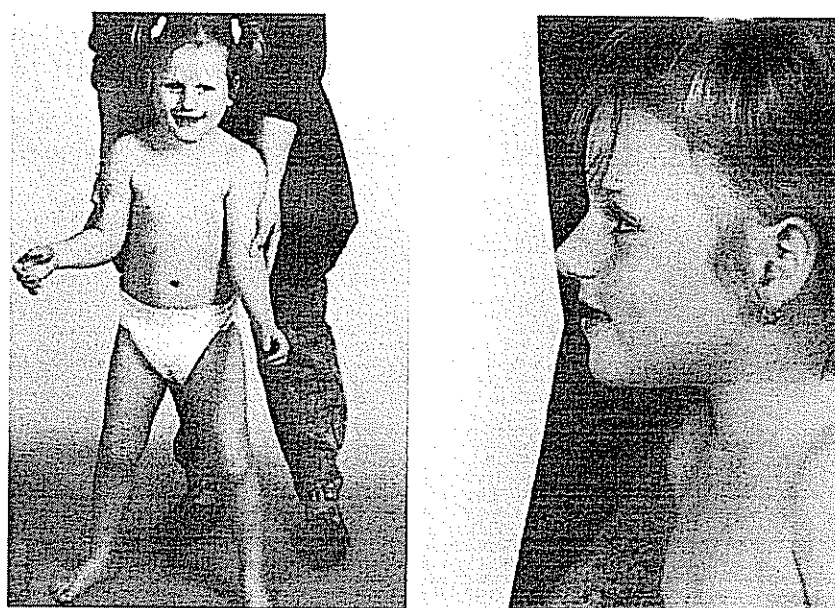



Fig. 5.26 Síndrome de Angelman em uma menina afetada de 4 anos Notar a abertura e a posição dos braços Comparar com o fenótipo da síndrome de Prader-Willi na Fig 5 25 Ver o texto para discussão. (Foto por cortesia de Jan M Friedman De Magenis R E., Toth-Fejel S., Allen L J., *et al* (1990) Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences Am J Med Genet 35:333-349 Copyright © 1990, Wiley-Liss, Inc Reimpresso com permissão de John Wiley and Sons, Inc.)

Cap. 16). O mosaicismo para mutações de genes únicos, de células somáticas ou germinativas, parece ser uma explicação provável para várias observações clínicas incomuns.

Mosaicismo Somático

Uma mutação que afeta a morfogênese e ocorre durante o desenvolvimento embrionário pode se manifestar como uma anomalia segmentar ou em trechos, dependendo do estágio no qual a mutação ocorreu e da linhagem de células somáticas nas quais se originou. Se ocorrer em um estágio inicial, antes da separação das células germinativas das somáticas, ela estará presente em ambas as linhagens e, portanto, será transmitida para a prole em sua forma completa, bem como será expressa somaticamente em forma de mosaico.

A NF1 às vezes é segmentar, afetando apenas uma parte do corpo. Em tais casos, o paciente tem genitores normais, mas se tiver um filho afetado, o fenótipo da criança será típico de NF1, isto é, não-segmentar. A possível causa da NF1 segmentar é uma mutação em uma ancestral da célula somática do segmento afetado. Nos casos nos quais a NF1 é transmitida geneticamente por um paciente que tem a forma segmentar, entretanto, a mutação deve ter ocorrido antes da separação das células germinativas das somáticas que possuem a mutação.

O mosaicismo somático também foi documentado em vários distúrbios ligados ao X tanto em homens quanto em mulheres. Um exemplo marcante é o caso da disfunção do ciclo hepático da uréia devido a uma deficiência da enzima ornitina transcarbamilase (OTC) em um menino com uma forma branda incomum do distúrbio. Os estudos moleculares demonstraram que o menino tinha mosaicismo somático para uma deleção no gene OTC. O mosaicismo somático também foi relatado para a hemofilia A e a DMD em mulheres que transmitem a mutação e, portanto, devem ter tido um mosaicismo de linhagem germinativa, bem como somático.

Mosaicismo de Linhagem Germinativa

Como já foi discutido neste capítulo, a chance de que um distúrbio decorrente de uma nova mutação autossômica dominante possa ocorrer mais de uma vez em uma prole é muito baixa, pois as mutações em geral são raras (da ordem de 1 chance em 10^5 a 10^6), e ter duas que ocorram independentemente no mesmo gene na mesma família é muito improvável. É freqüente, portanto, informar os genitores de um filho que aparentemente possui uma mutação nova de que a chance do mesmo defeito surgir em um filho subseqüente é desprezível, equivalente ao risco populacional. Existem, entretanto, raras exceções nas quais os genitores que são fenotipicamente normais têm mais de um filho afetado. Supondo-se que os genitores não foram incorretamente diagnosticados como homozigotos fenotipicamente normais devido à expressividade variável ou à penetrância reduzida da doença, tais heredogramas incomuns podem ser explicados por **mosaicismo na linhagem germinativa**. Durante o início do desenvolvimento do genitor, uma mutação somática ocorreu em uma célula da linhagem germinativa ou precursora, persistiu em todas as descendentes clonais desta célula e, eventualmente, atingiu uma proporção dos gametas (ver Fig. 5.27). Existem cerca de 30 mitoses nas células da linhagem germinativa antes da meiose na mulher e várias centenas no homem, criando uma grande oportunidade para que ocorram mutações durante os estágios mitóticos do desenvolvimento dos gametas (ver Cap. 2).

Agora que o fenômeno de mosaicismo da linhagem germinativa foi reconhecido, os geneticistas estão cientes da potencial imprecisão em prever que um fenótipo autossômico dominante específico que aparece em cada teste seja uma mutação nova, tendo um risco desprezível de recorrência na prole. O mosaicismo de linhagem germinativa está bem documentado em até 6% das formas graves e letais do distúrbio autossômico dominante **osteogênese imperfeita** (Fig. 5.28) (ver Cap. 12), no qual as mutações nos genes de colágeno tipo 1 levam a um colágeno anormal, ossos frágeis e fraturas freqüentes. Os heredogramas que podem ser explicados por mosaicismo na linhagem germinativa foram relatados para vários outros distúrbios bem conhecidos, tais como a hemofilia A e B e a DMD, mas não têm sido vistos em outras doenças dominantes, tais como a acondroplasia. A medida precisa da freqüência de mosaicismo de linhagem germinativa é difícil, mas as estimati-

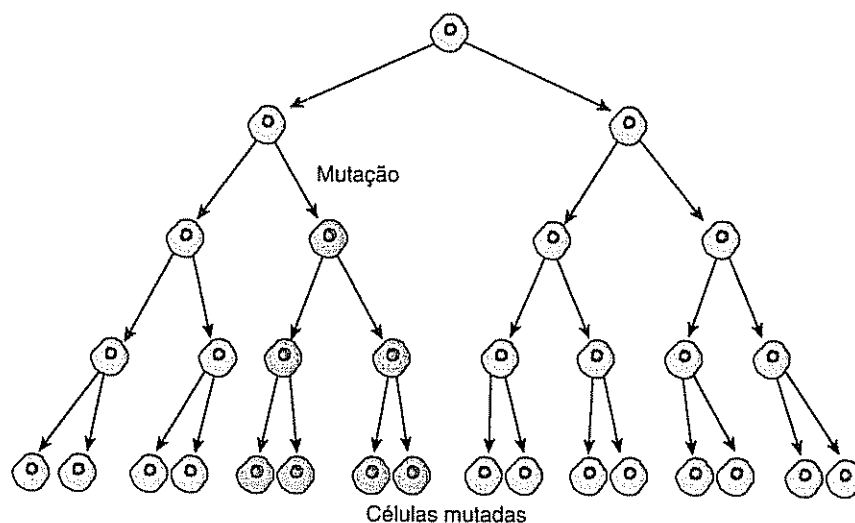



Fig. 5.27 Apresentação esquemática das divisões celulares mitóticas. Uma mutação que ocorre durante a proliferação celular, em células somáticas ou durante a gametogênese, leva a uma proporção de células com a mutação, isto é, a uma mutação somática ou germinativa.

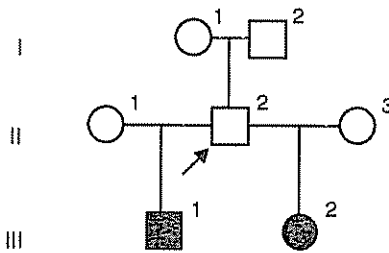



Fig. 5.28 Heredograma demonstrando a recorrência do distúrbio autossômico dominante osteogênese imperfeita Ambas as crianças afetadas têm a mesma mutação de ponto em um gene de colágeno Seu pai (*seta*) não é afetado e não tem tal mutação no DNA dos tecidos somáticos examinados Ele deve ter sido um mosaico para a mutação em sua linhagem germinativa

vas sugerem que a mais alta incidência encontrada hoje em dia é na DMD, na qual de 14% a 15% das mães de casos isolados não apresentam evidência de mutação em seus tecidos somáticos e possuem a mutação em sua linhagem germinativa. Assim, nas doenças conhecidas como apresentando mosaicismo de linhagem germinativa, os pais fenotipicamente normais de uma criança cuja doença é tida como sendo devida a uma nova mutação devem ser informados de que o risco de recorrência não é desprezível. O risco exato de recorrência é, entretanto, difícil de avaliar porque depende de em que proporção os gametas contêm a mutação De modo mais geral, os genitores aparentemente não-portadores de uma criança com um distúrbio autossômico dominante ou ligado ao X no qual a ocorrência de mosaicismo seja desconhecida também podem ter algum risco de recorrência, que pode ser tão alto quanto 3% a 4%. Estes casais devem receber um teste diagnóstico pré-natal que seja apropriado.

Herança Materna de Mutações Mitocondriais

O cromossomo mitocondrial (mtDNA) é uma molécula circular de aproximadamente 16,5 kb situada na organela mitocôndria, não no núcleo, como descrito no Cap. 3. Duas características incomuns das mitocôndrias resultam em um padrão diferente de doenças causadas por mutações no mtDNA. Primeira, o ovócito, e não o espermatozóide, fornece ao zigoto todas as suas mitocôndrias. Em conseqüência, uma mãe portadora de uma mutação no mtDNA transmitirá a mutação para *toda* a sua prole, enquanto um pai portador da mesma mutação não a passará para ninguém. Os defeitos no mtDNA demonstram, portanto, uma **herança materna**. Outra característica única do cromossomo mitocondrial é a ausência da segregação rigidamente controlada vista em cromossomos no genoma nuclear. Na divisão celular, o mtDNA replica-se e é distribuído aleatoriamente entre as novas mitocôndrias sintetizadas, que por sua vez são distribuídas aleatoriamente entre as duas células filhas. Cada célula filha pode receber proporções muito diferentes de mitocôndrias levando mtDNA normal e mutante (ver Fig. 12.33). Como as mitocôndrias funcionam quase essencialmente em todas as células e a expressão fenotípica de uma mutação no mtDNA depende das proporções relativas de mtDNA normal e mutante nas células que constituem tecidos diferentes, a penetrância reduzida, a expressividade variável e a pleiotropia são características típicas dos heredogramas de distúrbios mitocondriais. As doenças causadas por mutações no mtDNA serão discutidas em detalhes no Cap. 12.

RESUMO

Uma determinação precisa do heredograma familiar é uma parte importante do trabalho com cada paciente. Os heredogramas podem demonstrar um padrão direto, típico de herança mendeliana, ou um padrão mais atípico, como visto no *imprinting*, nas mutações mitocondriais e no mosaicismo germinativo. Determinar o padrão de herança não só é importante para fazer um diagnóstico do probando, mas também identifica outros indivíduos na família que podem estar em risco e precisam de avaliação e informação. A despeito dos sofisticados testes citogenéticos e moleculares disponíveis aos geneticistas, uma história familiar precisa, incluindo o heredograma familiar, ainda é um instrumento fundamental para os médicos e consultores genéticos usarem nos cuidados de seus pacientes.

Referências Gerais

Jones KL (1996) Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia.

McKusick VA (1998) Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders, 12th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore. See online version at *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/*.

Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (1997) Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) (2000) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Vogel F, Motulsky AG (1997) Human Genetics: Problems and Approaches, 3rd ed. Springer-Verlag, New York.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB (1988) Genetic disorders in children and young adults: A population study. Am J Hum Genet 42:677–693.

Cassidy SB, Schwartz S (1998) Prader-Willi and Angelman syndromes, disorders of genomic imprinting. Medicine 77:140–151.

Costa T, Scriver CR, Childs B (1985) The effect of mendelian disease on human health: A measurement. Am J Med Genet 21:231–242.

Jiang Y, Tsai TF, Bressler J, Beaudet AL (1998) Imprinting in Angelman and Prader-Willi syndromes. Curr Opin Genet Dev 8:334–342.

Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. Trends Genet 14:194–200.

Shoffner JM, Wallace DC (1992) Mitochondrial genetics: Principles and practice. Am J Hum Genet 51:1179–1186.

Smahi A, Courtois G, Vabres P, et al (2000) Genomic rearrangement in NEMO impairs NF-kappaB activation and is a cause of incontinentia pigmenti. Nature 405:466–472

Zlotogora J (1998) Germ line mosaicism. Hum Genet 102:381–386.

Problemas

1. Cathy está grávida pela segunda vez. Seu primeiro filho, Donald, tem CF. Cathy tem dois irmãos, Charles e Colin, e uma irmã, Cindy. Colin e Cindy são solteiros. Charles é casado com uma mulher não-aparentada, Carolyn, e tem uma filha de 2 anos de idade, Debbie. Os pais de Cathy são Bob e Betty. A irmã de Betty, Barbara, é a mãe do marido de Cathy, Calvin, que tem 25 anos. Não há história familiar prévia de CF.
   (a) Faça o heredograma, usando os símbolos padrão.
   (b) Qual o padrão de transmissão da CF e qual o risco de CF para o próximo filho de Cathy?

(c) Como o risco de CF nos primos em primeiro grau de Donald compara-se ao risco da população de 1/2 000?
(d) Que pessoas neste heredograma são heterozigotos obrigatórios?

2. George e Grace, que têm audição normal, têm 8 filhos. Duas de suas 5 filhas e 2 de seus 3 filhos são congenitamente surdos. Outro casal, Harry e Helen, ambos com audição normal, também têm 8 filhos; 2 de suas 6 filhas e 1 de seus 2 filhos são surdos. Um terceiro casal, Gilbert e Gisele, que são congenitamente surdos, têm 4 filhos, também surdos. Sua filha Hedy casou-se com Horace, um filho surdo de George e Grace, e Hedy e Horace, por sua vez, têm 4 filhos surdos. Seu filho mais velho, Isaac, casou-se com Ingrid, uma filha de Harry e Helen. Embora tanto Isaac quanto Ingrid sejam surdos, todos os seus 6 filhos têm audição *normal*. Faça o heredograma e responda às perguntas que se seguem. (Pista: quantos tipos diferentes de surdez congênita estão se segregando neste heredograma?)
(a) Cite os prováveis genótipos das crianças na última geração.
(b) Por que todos os filhos de Gilbert e Gisele e de Hedy e Horace são surdos?

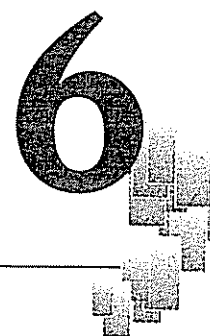
3. Considere as seguintes situações:
(a) A retinite pigmentosa ocorre nas formas ligada ao X e autossômica.
(b) Dois genitores têm um caso típico de hipercolesterolemia familiar diagnosticada com base na hipercolesterolemia, *arcus corneae*, xantomas tendinosos e demonstram deficiência de receptores de LDL, juntamente com uma história familiar do distúrbio. Eles têm um filho que teve um nível plasmático de colesterol muito alto ao nascimento e dentro de alguns meses desenvolveu xantomas e aterosclerose generalizada.
(c) Um casal com visão normal, de uma comunidade isolada, teve um filho com atrofia de giro autossômica recessiva da retina. A criança cresceu, casou-se com outro membro (com visão normal) da mesma comunidade e teve um filho com o mesmo distúrbio ocular.
(d) Uma criança tem uma grave neurofibromatose (NF1). Seu pai é fenotipicamente normal; sua mãe parece clinicamente normal, mas tem várias áreas *café-au-lait* e áreas de hipopigmentação, e o exame de lâmpada de fenda mostra que ela tem alguns nódulos de Lisch (crescimentos hamartomatosos na íris que são comuns nas pessoas com NF1).
(e) Pais de estatura normal têm um filho com acondroplasia.
(f) Um homem adulto com distrofia miotônica tem catarata, calvície frontal e hipogonadismo, além de miotonia.
(g) Um homem com raquitismo resistente à vitamina D transmite a condição para todas as suas filhas, que têm uma forma da doença mais branda que seu pai. Nenhum de seus filhos é afetado. As filhas têm aproximadamente números iguais de filhos não-afetados, filhos afetados, filhas não-afetadas e filhas afetadas. Os filhos afetados são mais gravemente afetados que suas irmãs afetadas.
(h) Um menino teve distrofia muscular progressiva com início no começo da infância e ficou em cadeira de rodas por volta dos 12 anos. Um homem não-aparentado também tem distrofia muscular progressiva, mas ainda está andando aos 30 anos. A análise molecular mostra que ambos os pacientes têm grandes deleções no gene de distrofina, que codifica a proteína que está deficiente ou defeituosa nos tipos Duchenne e Becker de distrofia muscular.
(i) Descobre-se que um paciente com um distúrbio recessivo herdou ambas as cópias de um cromossomo do mesmo genitor e nenhum representante deste cromossomo do outro genitor.
(j) Uma criança com doença da urina em xarope de bordo nasce de genitores que são primos em primeiro grau.

Quais dos conceitos citados a seguir são ilustrados pelas situações descritas anteriormente?

Expressividade variável
Dissomia uniparental
Consangüinidade
Endogamia
Herança dominante ligada ao X
Mutação nova
Heterogeneidade alélica
Heterogeneidade de locus
Homozigose para uma característica autossômica dominante
Pleiotropia

4. Don e seu avô materno, Barry, têm hemofilia A. Diane, mulher de Don, é a filha de sua tia materna. Don e Diane têm um filho, Edward, e duas filhas, Elise e Emily, todos com hemofilia A. Também têm uma filha não-afetada, Enid.
(a) Faça o heredograma.
(b) Por que Elise e Emily são afetadas?
(c) Qual a probabilidade de que um filho de Elise seja hemofílico? Qual a probabilidade de que sua filha seja hemofílica?
(d) Qual a probabilidade de que um filho de Enid seja hemofílico? E uma filha?

5. Nasceu um menino com várias malformações, mas que não tem uma síndrome reconhecível. Os genitores não são parentes e não há história familiar de uma condição similar. Qual das condições que se seguem poderia explicar a situação? Quais são improváveis? Por quê?
(a) Herança autossômica dominante com mutação nova
(b) Herança autossômica dominante com penetrância reduzida
(c) Herança autossômica dominante com expressividade variável
(d) Herança autossômica recessiva
(e) Herança recessiva ligada ao X
(f) Herança autossômica dominante, erro de paternidade
(g) Ingestão materna de uma droga teratogênica em um estágio sensível do desenvolvimento embrionário

6. Um casal tem um filho com NF1. Ambos os genitores são clinicamente normais e nenhuma das famílias apresenta uma história familiar positiva.
(a) Qual a explicação provável para a NF1 em seu filho?
(b) Qual o risco de recorrência em outros filhos deste casal?
(c) Se o marido tivesse outro filho com outra mulher, qual seria o risco de NF1?
(d) Qual o risco de que alguém na prole do afetado também tenha NF1?

Variação Genética em Indivíduos: Mutação e Polimorfismo

Este capítulo é um dos vários nos quais exploraremos a natureza das diferenças geneticamente determinadas entre as pessoas. Embora a base das diferenças fenotípicas possa ser ou mudanças genéticas codificadas no DNA ou diferenças não-genéticas no ambiente, neste capítulo lidaremos com as diferenças permanentes entre as pessoas nas seqüências de nucleotídeos de seus genomas e o efeito destas diferenças, se é que alguma, no fenótipo. A seqüência do DNA nuclear é quase 99,9% idêntica entre quaisquer dois seres humanos. É exatamente esta pequena fração de seqüências de DNA que é diferente entre as pessoas que é responsável pela variabilidade geneticamente determinada entre os humanos. Logicamente, algumas diferenças de seqüência de DNA têm pouco ou nenhum efeito no fenótipo, enquanto outras diferenças são diretamente responsáveis por causar doenças. Entre estes dois extremos está a variação responsável pela variabilidade fenotípica geneticamente determinada na anatomia, na fisiologia, nas intolerâncias dietéticas, nas respostas terapêuticas ou nas reações adversas a medicações, na suscetibilidade à infecção, na predisposição ao câncer e mesmo na variabilidade em várias caracteristicas de personalidade, aptidão atlética e talento artístico. Um dos importantes conceitos da genética humana e médica é que a doença genética é a manifestação mais óbvia, e em geral a mais extrema, das diferenças genéticas, superposta sobre um fundo de variabilidade genética totalmente normal.

MUTAÇÃO

A Natureza da Mutação Humana

A mutação é definida como qualquer mudança na seqüência de nucleotídeos ou arranjo do DNA. Em termos amplos, as mutações podem ser classificadas em três categorias: as mutações que afetam o número de cromossomos na célula (**mutações genômicas**), as mutações que alteram a estrutura de cromossomos individuais (**mutações cromossômicas**) e as mutações que alteram genes individuais (**mutações gênicas**) (Quadro 6.1). As mutações genômicas são alterações no número de cromossomos intatos (chamadas **aneuploidias**) que surgem de erros de segregação cromossômica durante a meiose ou mitose. As mutações cromossômicas são desequilíbrios que envolvem apenas uma parte de um cromossomo, tais como as duplicações, deleções, inversões e translocações, que podem ocorrer espontaneamente ou podem resultar da segregação anormal de cromossomos translocados durante a meiose. As mutações gênicas são mudanças na seqüência de DNA, que variam de apenas um único nucleotídeo a mudanças que podem afetar muitos milhares de pares de bases, mas sempre em uma escala muito pequena para ser vista mesmo com a análise citogenética de alta resolução.

Uma mutação genômica que deleta ou duplica um cromossomo inteiro altera a dosagem e, portanto, os níveis de expressão de centenas ou milhares de genes. Similarmente, uma mutação cromossômica que deleta ou duplica grandes partes de um ou mais cromossomos também pode afetar a expressão de milhares de genes. Mesmo uma pequena mutação gênica pode ter grandes efeitos, dependendo de que gene foi alterado e de que efeito a alteração tem na expressão do gene. Uma mutação gênica que consista na mudança de um único nucleotídeo na seqüência codificante de um determinado gene pode levar a uma perda completa de expressão do gene ou à formação de uma proteína variante com propriedades alteradas. As mudanças fenotípicas produ-

QUADRO 6-1

Tipos de Mutações e suas Freqüências Estimadas

Classe de Mutação	Mecanismo	Freqüência (Aproximada)	Exemplos
Mutação genômica	Não-disjunção dos cromossomos	10^{-2}/divisão celular	Aneuploidia
Mutação cromossômica	Rearranjo cromossômico	6×10^{-4}/divisão celular	Translocações
Mutação gênica	Mutação de par de bases	10^{-10}/par de bases/divisão celular $10^{-5} - 10^{-6}$/locus/geração	Mutações de ponto

Baseado em Vogel F., Motulsky A. G. (1997) Human Genetics, 3.ª ed. Springer-Verlag, Berlim.

zidas pelas mutações gênicas serão consideradas em detalhes nos Caps. 11 e 12.

Algumas mudanças no DNA, entretanto, podem não ter efeito fenotípico. Uma mutação cromossômica pode não afetar uma parte crucial do genoma e pode não ter nenhum efeito fenotípico. Uma mutação dentro de um gene pode não ter nenhum efeito porque a mudança não altera a seqüência primária de aminoácidos de um polipeptídeo ou porque, mesmo que o faça, a mudança resultante na seqüência do aminoácido codificado não altera as propriedades funcionais do polipeptídeo. Nem todas as mutações, portanto, têm conseqüências clínicas.

Todos os três tipos de mutação ocorrem em freqüências apreciáveis em muitas células diferentes. Se uma mutação ocorrer no DNA de células que irão popular a linhagem germinativa, a mutação será uma mudança herdável, que pode ser passada adiante para as gerações futuras. Em contraste, algumas mutações — as **mutações somáticas** — ocorrem apenas por acaso em um subgrupo de células de apenas alguns tecidos e resultam em mosaicismo somático, como visto, por exemplo, em muitos casos de câncer. As mutações somáticas não podem ser transmitidas para a geração seguinte.

Fig. 6.1 Exemplos de mutações gênicas. A primeira base do segundo códon está mutada por uma substituição de base, deleção ou inserção. Tanto a deleção quanto a inserção de um só par de bases leva a uma mudança de matriz de leitura, na qual o molde de tradução é alterado. Ver o texto para discussão.

A Origem das Mutações

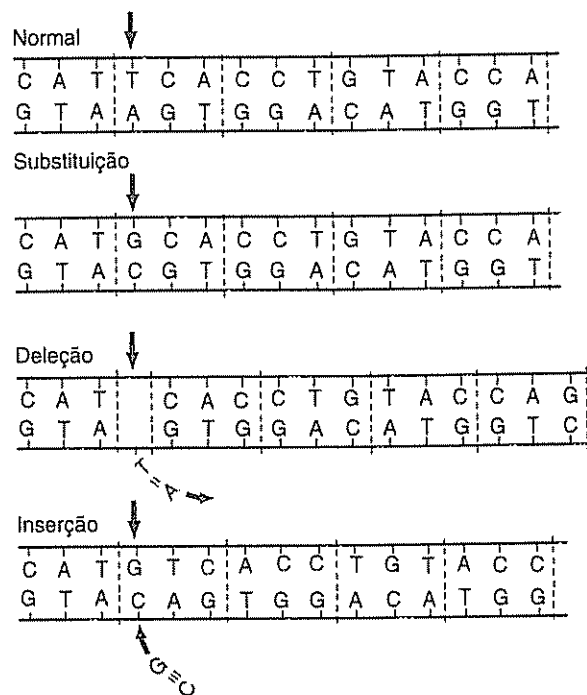
Mutações Genômicas

Como discutiremos ao longo do Cap. 9, a má segregação de um par cromossômico durante a meiose causa mutações genômicas responsáveis por condições tais como a trissomia do 21 (síndrome de Down). As mutações genômicas produzem aneuploidia cromossômica e são as mutações mais comuns vistas em seres humanos (ver Quadro 6.1), com uma taxa de um evento de má segregação por 25 a 50 divisões de células meióticas (ver Cap. 9). Esta estimativa é claramente o mínimo, pois as conseqüências desenvolvimentais de muitos destes eventos podem ser tão graves que os fetos aneuplóides resultantes são espontaneamente abortados logo após a concepção sem que sejam detectados. As mutações genômicas também são muito comuns nas células cancerosas (ver Cap. 16).

Mutações Cromossômicas

As mutações cromossômicas ocorrem com muito menos freqüência que as mutações genômicas, ocorrendo a uma taxa de cerca de um rearranjo por 1.700 divisões celulares. Embora as freqüências das mutações genômicas e cromossômicas possam parecer altas, estas mutações raramente são perpetuadas de uma geração para a seguinte, pois, em geral, são incompatíveis com a sobrevida ou a reprodução normal. As mutações cromossômicas também são vistas freqüentemente nas células cancerosas (ver Cap. 16).

Mutações Gênicas

As mutações gênicas, incluindo as substituições de pares de bases, inserções e deleções (Fig. 6.1), podem se originar por um de dois mecanismos básicos: erros introduzidos durante o processo normal de replicação do DNA ou mutações que surgiram por falha no reparo de danos ao DNA. Algumas mutações são espontâneas, enquanto outras são induzidas por agentes físicos ou químicos, chamados **mutágenos** porque estes agentes aumentam muito a freqüência de mutações.

Erros de Replicação do DNA. A grande maioria dos erros de replicação é rapidamente removida do DNA e corrigida por uma série de enzimas de reparo do DNA que primeiro reconhecem que filamento na dupla hélice recém-sintetizada contém a base incorreta e então a substitui pela base complementar apropriada, um processo chamado de "revisão". A replicação do DNA (ver Fig. 3.4) precisa ser um processo extremamente preciso, pois mesmo que as mutações sejam introduzidas apenas uma vez a cada milhão de pares de bases, a carga da mutação sobre o organismo seria intolerável, e nossa espécie não existiria mais. Na verdade, a maquinaria de replicação do DNA faz mais do que gerar uma mutação a cada milhão de bases. Por meio de uma combinação de regras estritas de pareamento de bases (A pareando com T e C com G) e revisão molecular, a enzima DNA polimerase duplica fielmente a dupla hélice, embora introduza um nucleotídeo incorreto em um dos filamentos filhos em crescimento a cada 10 milhões de pares de bases (isto enquanto se move ao longo de um cromossomo humano a uma velocidade de cerca de 20 pares de bases por segundo!). Uma verificação adicional dos erros de replicação corrige então mais de 99,9% dos erros de replicação do DNA. Assim, a taxa geral de mutação como um resultado de erros de replicação é tão baixo quanto 10^{-10} por par de bases por divisão celular. Como o genoma humano diplóide contém aproximadamente 6×10^9 pares de bases do DNA, os erros de replicação introduzem menos de uma mutação de par de bases por divisão celular.

Mutação Durante o Reparo de Dano ao DNA. Além dos erros de replicação, as mutações podem ser causadas por processos químicos espontâneos, tais como depurinação, desmetilação ou desaminação, por reação com mutágenos químicos (naturais ou outros) no ambiente e por exposição à radiação

ultravioleta ou ionizante. Em contraste com as mudanças no DNA relacionadas à replicação, que em geral são corrigidas por mecanismos de revisão, as mudanças de nucleotídeos introduzidas por danos ao DNA em geral ficam como mutações permanentes.

A BASE MOLECULAR DAS MUTAÇÕES E SUA DETECÇÃO

Muitos tipos de mutação são representados entre os diversos alelos detectados em loci individuais. Subjacentes tanto à variação normal na população quanto aos exemplos de doenças herdadas, mutações que variam desde mudanças em um só par de bases até a deleção de muitos milhões de pares de bases já foram documentadas. Com a atual aplicação aparentemente rotineira de técnicas moleculares à detecção e elucidação das mutações, um grande número de mutações específicas está sendo descoberto em vários distúrbios genéticos diferentes. A descrição de mutações diferentes não só aumenta o conhecimento da diversidade genética humana e da fragilidade da herança genética humana, como também, e mais significativamente, contribui com informações para a detecção e a triagem de doenças genéticas em determinadas famílias em risco, bem como, para algumas doenças, na população em geral.

Aqui consideraremos a natureza das diferentes mutações, seus mecanismos subjacentes e seu efeito nos genes envolvidos. Nos Caps. 11 e 12, voltaremos aos modos pelos quais as mutações causam doenças. Cada tipo de mutação discutida aqui é ilustrada por um ou mais exemplos de doenças. Devemos lembrar, entretanto, que as mutações na maioria das doenças genéticas são bem heterogêneas. Portanto, casos diferentes de um determinado distúrbio em geral serão causados por mutações subjacentes diferentes (ver o boxe).

Substituições de Nucleotídeos

Uma única substituição de nucleotídeos (ou **mutação de ponto**) em uma seqüência de DNA pode alterar o código em uma trinca de bases e causar a substituição de um aminoácido por outro no produto gênico. Tais mutações são chamadas de **mutações de sentido trocado** porque alteram o "sentido" do filamento codificante do gene, especificando um aminoácido diferente. Em muitos distúrbios, tais como as hemoglobinopatias descritas no Cap. 11, a grande maioria das mutações detectadas é de sentido trocado. As mutações de sentido trocado contribuem com mais da metade de todas as mutações relatadas como causadoras de doenças genéticas em seres humanos.

Outras substituições de bases que ocorrem dentro ou fora das seqüências codificantes de um gene também podem ter grandes efeitos no produto gênico ou interferir diretamente no próprio processo de transcrição. Como será discutido em detalhes no Cap. 11, várias mutações na região 5′ do promotor ou na região 3′ não-traduzida do gene de beta-globina levam a uma intensa diminuição na quantidade de mRNA de beta-globina processado produzido. De fato, tais mutações foram cruciais para elucidar a importância da expressão gênica de determinados nucleotídeos nestas regiões.

Mutações de Término de Cadeia

Normalmente, a tradução do mRNA pára quando é atingido um códon finalizador (ver Cap. 3). Uma mutação que cria um códon finalizador pode causar o término prematuro da tradução, enquanto uma mutação que destrói um códon finalizador permite que a tradução continue até que o próximo códon finalizador seja atingido. Uma mutação que gera um dos três códons "fim" é chamada de **mutação sem sentido**. Em geral, tais mutações não têm efeito na transcrição. Entretanto, o mRNA portador de uma mutação prematura geralmente é instável. Se o mRNA for suficientemente estável para ser traduzido, o produto truncado de tradução em geral será tão instável que será rapidamente degradado dentro da célula (**decomposição de mRNA mediado por falta de sentido**). As mutações prematuras de término constituem cerca de 12% de todas as mutações que causam doença.

Mutações de Recomposição (*Splicing*) de RNA

Como descrito no Cap. 3, o mecanismo normal pelo qual os íntrons são excisados a partir de RNA não-processado e os éxons são reunidos para formar um mRNA final depende de determinadas seqüências de nucleotídeos situadas nos limites íntron/éxon (sítio aceptor) e éxon/íntron (sítio doador) ou próximas a

Tipos de Mutações em Doenças Genéticas Humanas

Substituições de Nucleotídeos (Mutações de Ponto)

Mutações de sentido trocado (substituições de aminoácidos).
Mutações sem sentido (códons finalizadores prematuros).
Mutações de processamento de RNA (destroem sítios de consenso de corte, sítios *cap* e sítios de poliadenilação ou criam sítios crípticos). A recomposição anormal em geral leva a mudanças de matriz de leitura e códons finalizadores prematuros.
Mutações reguladoras que afetam a ligação de fator de transcrição, controle transcricional ou outros aspectos da expressão gênica.

Deleções e Inserções

Adição ou deleção de um pequeno número de bases:
se o número de bases envolvidas não for um múltiplo de 3, causará uma mudança de matriz de leitura;
se o número de bases envolvidas for um múltiplo de 3, causará perda ou ganho de códons e, subseqüentemente, aminoácidos no produto traduzido.
Deleções gênicas maiores, inversões, fusões e duplicações (podem ser mediadas pela homologia de seqüência de DNA, seja dentro ou entre os filamentos de DNA).
Inserção de elemento L1 ou *Alu* (perturba a transcrição ou interrompe a seqüência codificante).
Expansão de seqüências de trinucleotídeos repetidos

esses limites. Duas classes gerais de mutações de recomposição já foram descritas. As mutações que afetam as bases necessárias no sítio doador ou no sítio aceptor interferem (e em alguns casos abolem) no corte normal do RNA neste sítio (ver Caps. 11 e 12). Uma segunda classe de mutação de recomposição envolve substituições de bases de íntron que não afetam as próprias seqüências doadora ou aceptora. Tais mutações criam sítios doadores e aceptores alternativos que competem com os sítios normais durante o processamento do RNA. Assim, em tais casos pelo menos uma proporção do mRNA final pode conter seqüências íntron impropriamente processadas. Os exemplos deste mecanismo de mutação também estão apresentados no Cap. 11. As mutações que afetam a recomposição são responsáveis por 10% das mutações relatadas como causadoras de doenças genéticas humanas

"Pontos Quentes" de Mutação

As mudanças nucleotídicas que envolvem a substituição de uma purina por outra (A ⟷ G) ou de uma pirimidina por outra (T ⟷ C) são chamadas de **transições**. Em contraste, a substituição de uma purina por uma pirimidina (ou vice-versa) é chamada de **transversão**. Se as substituições de nucleotídeos fossem aleatórias, deveria haver tantas transversões quanto transições, pois cada base pode sofrer duas transversões, mas apenas uma transição. Entretanto, processos mutagênicos diferentes podem causar preferencialmente um ou outro tipo de substituição. Assim, o achado de uma freqüência maior de transições do que o esperado entre uma coleção de alelos mutantes é tido como uma evidência de um mecanismo favorecido de mutação em vez de uma substituição espontânea ou aleatória de bases.

A compreensão do excesso de transições entre substituições de um só par de bases causando doenças genéticas veio com a descoberta de que uma forma importante de modificação do DNA no genoma humano envolve a **metilação** de citosinas (para formar 5-metilcitosina), especificamente quando elas estão situadas imediatamente a 5′ de uma guanina (p. ex., como o dinucleotídeo 5′-CG-3′). A desaminação espontânea de 5-metilcitosina em timina (compare as estruturas da citosina e timina na Fig. 3.1) no par CG origina transições C→ T ou G → A (dependendo de em qual filamento do DNA a 5-metilcitosina está mutada). Mais de 30% de todas as substituições de um só nucleotídeo são deste tipo, e elas ocorrem a uma taxa 25 vezes maior que qualquer outra mutação de um único nucleotídeo. Assim, o par CG representa um verdadeiro "ponto quente" para mutação no genoma humano.

Deleções e Inserções

As mutações também podem ser causadas pela inserção, inversão, fusão ou deleção de seqüências de DNA. Algumas deleções e inserções envolvem apenas alguns nucleotídeos e em geral podem ser detectadas apenas por análise molecular envolvendo seqüenciamento de nucleotídeos. Em outros casos, um segmento substancial de um gene ou um gene inteiro é deletado, invertido, duplicado ou translocado para criar um novo gene híbrido. Tais mutações em geral são detectadas no nível da transferência de Southern de um DNA de um paciente ou pela análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) da junção. Em raros casos, as deleções são grandes o suficiente para que sejam visíveis no nível citogenético. Para que sejam detectadas mesmo com bandeamento pró-metafásico de alta resolução, estas mutações em geral devem deletar pelo menos de 2 a 4 milhões de pares de bases do DNA. Em muitos casos, tais deleções removem mais que um único gene e estão associadas a uma **síndrome de genes contíguos** (ver Cap. 10).

Pequenas Deleções ou Inserções

Algumas deleções e inserções afetam apenas um pequeno número de pares de bases. Quando o número de bases envolvidas não é um múltiplo de três (não é um número integral de códons), e quando ocorre em uma seqüência codificante, a matriz de leitura é alterada, começando no ponto da inserção ou deleção. É gerada, portanto, uma seqüência diferente de aminoácidos no terminal carboxila. Estas mutações também são chamadas de **mudanças de matriz de leitura**. Outras pequenas inserções ou deleções não causam a mudança de matriz de leitura porque o número de pares de bases envolvidos é um múltiplo de três. Elas produzirão uma inserção ou uma deleção do aminoácido correspondente no produto gênico traduzido. As deleções ou inserções de apenas alguns pares de bases constituem quase um quarto de todas as mutações responsáveis pelas doenças genéticas humanas.

Grandes Deleções e Inserções

As alterações na estrutura gênica grandes o suficiente para que sejam detectadas pela transferência de Southern são incomuns (cerca de 6% das mutações causadoras de doenças), mas foram descritas em muitos distúrbios hereditários. A freqüência de tais mutações difere acentuadamente entre doenças genéticas diferentes. Alguns distúrbios são caracterizados por uma alta freqüência de deleções detectáveis, enquanto em outros a deleção é uma causa muito rara de mutação. Por exemplo, as deleções dentro do grande gene de distrofina no cromossomo X na distrofia muscular Duchenne estão presentes em mais de 60% dos casos (ver Cap. 12). Muitos casos de α-talassemia são devidos à deleção de um dos dois genes de α-globina no cromossomo 16, enquanto a β-talassemia apenas raramente se deve à deleção do gene de β-globina (ver Cap. 11). Em alguns casos, a base para a deleção gênica é bem compreendida e provavelmente é mediada pela recombinação aberrante entre múltiplas cópias de seqüências de DNA similares ou idênticas. Em outros casos, a base para a deleção é desconhecida.

A inserção de grandes quantidades de DNA é uma causa de mutação muito mais rara que a deleção. Entretanto, um mecanismo novo de mutação foi descrito em dois casos não-correlacionados e esporádicos de hemofilia A. Como discutido no Cap. 3, a família L1 de seqüências intercalares repetitivas representa uma classe de DNA repetido que pode ser transcrita em um RNA que, quando reversamente transcrito, gera uma seqüência de DNA que pode se inserir em pontos diferentes do genoma. Em alguns pacientes com hemofilia A, seqüências L1 com vários kb de tamanho foram encontradas inseridas em um éxon no gene do fator VIII, interrompendo a seqüência codificante e inativando o gene. Este achado sugere que pelo menos algumas das estimadas 100.000 cópias da família L1 no genoma humano são capazes de causar doença por mutagênese insercional.

Deleções e Duplicações Causadas por Recombinação

Uma causa importante de mutação em alguns distúrbios envolve deleção ou duplicação mediada por recombinação entre seqüên-

cias de DNA similares ou idênticas. Existem muitos genes como membros de famílias multigênicas (ver Cap. 3). Quando os membros de tal família gênica estão situados em tandem na mesma região cromossômica, eles às vezes ficam desalinhados e fazem um pareamento errado na meiose (quando os dois homólogos ficam pareados) ou na mitose após a replicação (quando as duas cromátides irmãs em geral trocam DNA). A recombinação que ocorre entre cromossomos ou cromátides malpareados pode levar à deleção ou à duplicação. O mecanismo de **crossing over desigual** é tido como o responsável pela deleção de um dos genes de α-globina na α-talassemia (ver Cap. 11) e pela variação no número de cópias dos genes de pigmentos visuais verdes no grupo de genes de pigmento visual vermelho e verde no cromossomo X, tanto em pessoas com visão de cores normal quanto nos homens com defeitos ligados ao X na percepção da cor vermelha ou verde (Fig. 6.2A). Um pareamento e uma recombinação anormais entre duas seqüências similares em um único filamento de DNA também podem ocorrer. Dependendo da orientação destas seqüências, tal recombinação pode levar a uma deleção ou a uma inversão. Por exemplo, quase metade de toda a hemofilia A grave deve-se à recombinação que inverte um número de éxons, perturbando assim a estrutura gênica (ver Fig. 6.2B).

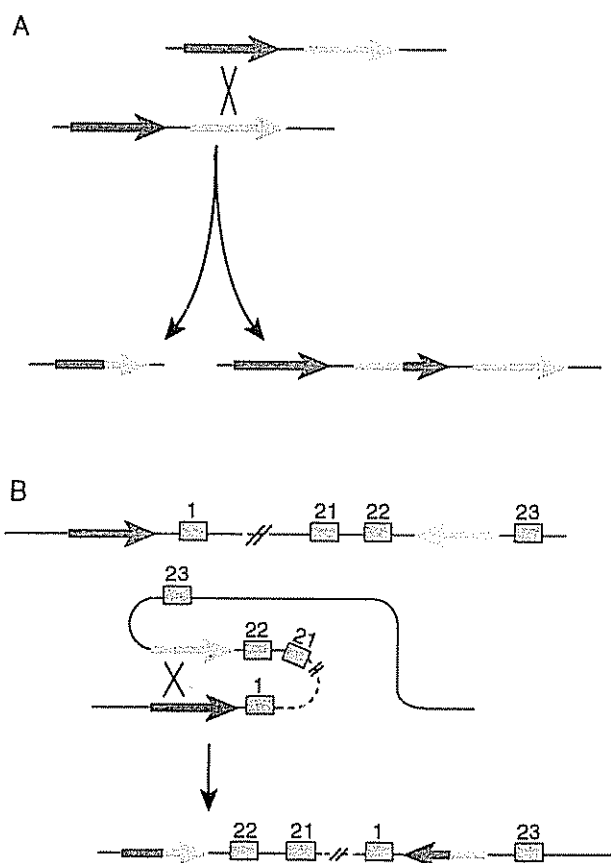



Fig. 6.2 A. Recombinação desigual mas homóloga entre cromátides irmãs desalinhadas ou cromossomos homólogos contendo seqüências altamente homólogas (*setas cinza e vermelhas*) levam a dois produtos, um com apenas uma cópia e um com três cópias da seqüência. Em B, a recombinação entre seqüências homólogas invertidas situadas distando 500 kb no mesmo filamento (uma antecedendo o gene do fator VIII e a outra no íntron 22 do gene) resulta na inversão dos éxons 1 até 22 do gene, perturbando o gene e causando hemofilia

A recombinação entre seqüências de DNA homólogas não-codificantes também pode causar doença genética. A recombinação entre membros diferentes da família *Alu* de DNA repetido intercalar (ver Cap. 3) foi documentada como a causa de uma duplicação de vários éxons no gene de receptor de lipoproteína de baixa densidade na hipercolesterolemia familiar (ver Cap. 12).

Finalmente, uma classe recém-descrita de mutações tem sido vista em distúrbios tais como a **doença de Huntington** e a **síndrome do X frágil** (Cap. 12). Nestas doenças, uma simples repetição de trinucleotídeo, situada na região codificante (no caso da doença de Huntington) ou em uma região transcrita mas não traduzida de um gene (no caso da síndrome do X frágil), pode se ampliar e interferir na expressão gênica normal. Uma repetição na região codificante gerará um produto proteico anormal, enquanto a expansão repetida nas partes transcritas mas não traduzidas de um gene pode interferir na transcrição ou no processamento do mRNA (ver Cap. 12).

À medida que os pesquisadores identificam e catalogam milhares de mutações em genes causadores de doenças, surge uma necessidade óbvia de que haja uma nomenclatura uniforme para descrever qualquer mutação, sem ambigüidades, nos bancos de dados que são os repositórios de toda essa informação (ver boxe).

Estimativas das Taxas de Mutações Gênicas Germinativas em Humanos

A taxa de mutação de um gene em geral é expressa pelo número de novas mutações por locus, por geração. O modo mais direto de avaliar a taxa é medir a incidência de um novo caso esporádico de uma doença genética autossômica dominante ou ligada ao X que é totalmente penetrante com um fenótipo claramente reconhecível ao nascimento ou logo após. A **acondroplasia** é uma destas doenças que atende aos requisitos para se avaliar diretamente uma taxa de mutação. Em um estudo, 7 crianças acondroplásicas nasceram em uma série de 242.257 nascimentos consecutivos. Todas nasceram de pais com estatura normal e, como a acondroplasia é totalmente penetrante, estes 7 casos foram considerados como decorrentes de mutações novas. Supondo-se um diagnóstico preciso, a nova taxa de mutação pode ser calculada como 7 novas mutações em um total de 2×242.257 alelos ou, aproximadamente, $1{,}4 \pm 0{,}5 \times 10^{-5}$ mutações por locus, por geração.

A taxa de mutação foi estimada para vários distúrbios herdados, como mostra o Quadro 6.2. A taxa de mutação gênica média é de cerca de 1×10^{-6} mutações por locus, por geração, mas as taxas variam em uma gama de 1.000 vezes, de 10^{-4} a 10^{-7} mutações por locus, por geração. A base destas diferenças pode estar relacionada ao tamanho do gene, à fração de alelos mutantes que dão um fenótipo particular observável, ao mecanismo mutacional ou à presença ou ausência de "pontos quentes" mutacionais, tais como os dinucleotídeos CG metilados, no gene. Os genes da **distrofia muscular Duchenne** e da **neurofibromatose** são ambos muito grandes, 2.000 kb de tamanho. Assim, não surpreende que as taxas de mutação nestes loci sejam bem altas. A **acondroplasia**, por outro lado, resulta quase exclusivamente de uma mutação em um ponto quente, uma mudança nucleotídica em um códon de glicina que substitui uma arginina na posição 380 (Gli380Arg) no receptor do fator de crescimento do fibroblasto. As estimativas no Quadro 6.2 refletem as medidas feitas em mutações bem visíveis e deletérias. As mutações menos graves ou óbvias escapariam à detecção, bem como as mutações letais mais graves. Assim, a taxa geral de novas mutações pode ser consideravelmente maior.

Nomenclatura das Mutações

1. A posição de uma mutação é designada como sendo no DNA genômico ou em uma seqüência de cDNA pelo prefixo g. ou c., respectivamente.
2. O A do início de transcrição ATG é designado +1. A base seguinte anterior é −1; não há 0.
3. Uma mudança de nucleotídeo é indicada primeiro pela base original, o número do nucleotídeo desta base, um símbolo maior que (>) e o novo nucleotídeo nesta posição. Por exemplo, uma mutação responsável por uma determinada mutação de sentido trocado que causa a doença de Tay-Sachs pode ser designada como c.G1444>A no cDNA.
4. Se a seqüência genômica total não for conhecida, os nucleotídeos em um íntron (designados pela expressão "seqüência intercalar", ou IVS) serão contados como +1, +2 etc., em que +1 é a não-variante G de GT no sítio doador do corte em 5′, ou como −1, −2 etc., contando a partir da não-variante G no sítio aceptor de corte AG em 3′. Uma mutação que substitui um A pelo T altamente conservado em um sítio doador de corte do íntron 33 de um gene é designada como g.IVS33+2T>A, enquanto uma mutação que substitui um T por um A no A altamente conservado de um sítio aceptor de corte no mesmo íntron é designada como g.IVS33−2A>T.
5. Pequenas deleções são indicadas pelo termo "del" escrito após os números de nucleotídeos deletados (1524-1527del).
6. Pequenas inserções são similarmente designadas pelo termo "ins" após os dois nucleotídeos entre os quais ocorreu a inserção, seguido dos nucleotídeos inseridos. Por exemplo, c.1277−1278insTATC indica uma inserção de quatro bases entre os nucleotídeos 1277 e 1278 no cDNA para hexosaminidase A, uma mutação comum que causa a doença de Tay-Sachs.
7. Se uma mutação sem sentido for descrita no nível de proteína, os aminoácidos (código de três letras; ver Quadro 3.1) serão numerados de modo que a metionina iniciadora seja designada como número 1. A mutação de sentido trocado na β-globina no aminoácido número 6 que causa a anemia falciforme converte um glutamato em valina e é designada Glu6Val (E6V). Uma mutação prematura de término causadora de β^0-talassemia, tal como a mutação que troca glutamina na posição 39 de β-globina por um códon finalizador, é chamada de Gln39X (Q39X).

As taxas de mutação também têm sido estimadas usando-se eletroforese para triar as proteínas do soro quanto às alterações de carga e tamanho, um método que independe da gravidade da mutação. O surgimento em uma criança de uma nova variante eletroforética que não está presente nos genitores sugere uma mutação que alterou a carga ou o tamanho da proteína codificada. Tais variantes são detectadas a uma freqüência de cerca de 2×10^{-6} por locus, por geração. Como apenas cerca de um terço de todas as mudanças de aminoácidos produz uma alteração detectável por eletroforese, a verdadeira taxa de novas mutações nas proteínas do soro usando este enfoque pode ser estimada como sendo de $3 \times 2 \times 10^{-6}$ ou 6×10^{-6} por locus, por geração.

A despeito das limitações destes e de outros enfoques para determinar a taxa média de mutação gênica, todos os métodos dão essencialmente a mesma gama de valores para as taxas de mutações germinativas: cerca de 10^{-4} a 10^{-6} por locus, por geração. Como existem cerca de 50.000 genes no genoma, isto sugere que, no mínimo, *pelo menos 1 em cada 20 pessoas provavelmente recebeu um novo gene mutado de um de seus genitores.*

Mutações Herdadas nas Diferenças Sexuais Humanas

Mutações novas podem ocorrer na linhagem germinativa durante qualquer divisão mitótica ou durante a divisão meiótica na espermatogênese ou ovocitogênese. Existem, entretanto, diferenças marcantes entre os sexos tanto no número quanto na época das divisões mitóticas e meióticas, diferenças que podem afetar a freqüência e os tipos de mutação em gametas paternos *versus* maternos.

QUADRO 6–2

Estimativas de Taxas de Mutação para Genes Humanos Selecionados

Doença	Herança	Locus (Proteína)	Taxa de Mutação*
Acondroplasia	AD	*FGFR3* (receptor 3 do fator de crescimento de fibroblasto)	$0,6-1,4 \times 10^{-5}$
Aniridia	AD	*AN2* (Pax6)	$2,9-5 \times 10^{-6}$
Distrofia muscular Duchenne	Ligado ao X	*DMD* (distrofina)	$3,5-10,5 \times 10^{-5}$
Hemofilia A	Ligado ao X	*F8* (fator VIII)	$3,2-5,7 \times 10^{-5}$
Hemofilia B	Ligado ao X	*F9* (fator IX)	$2-3 \times 10^{-6}$
Neurofibromatose, tipo 1	AD	*NF1* (neurofibromina)	$4-10 \times 10^{-5}$
Doença do rim policístico, tipo 1	AD	*PKD1* (policistina)	$6,5-12 \times 10^{-5}$
Retinoblastoma	AD	*RB* (Rb)	$5-12 \times 10^{-6}$

*Expressa como mutações/locus/geração
AD = autossômica dominante
Baseado em dados de Vogel F., Motulsky A. G. (1997) Human Genetics, 3.ª ed., Springer-Verlag, Berlim.

Na ovocitogênese, como vimos no Cap. 2, cada ovócito haplóide é o produto de cerca de 22 divisões mitóticas na vida fetal, após o que ocorre a meiose I, ficando então suspensa aí por anos ou mesmo décadas, até que a meiose I seja finalmente completada na época da ovulação. Há uma especulação de que quanto mais tempo os ovócitos ficam na meiose I, maior é a chance de que ocorra um erro quando as células finalmente completam a meiose. Estas características da ovocitogênese podem ajudar a explicar por que a não-disjunção meiótica que leva a mutações genômicas tais como as trissomias autossômicas dos cromossomos 13, 18 e 21 ocorre com muito mais freqüência na linhagem germinativa materna que na paterna e aumenta em freqüência com o aumento da idade da mãe e não do pai (ver Cap. 10).

A espermatogênese, por outro lado, envolve uma série contínua de divisões celulares durante a vida, resultando em um total de cerca de 1 trilhão de espermatozóides. Estas células são o resultado de cerca de 30 divisões mitóticas desde o estágio embrionário até a época da puberdade e de cerca de 20 a 25 ciclos de replicação por ano a partir daí. Considerando uma freqüência de 10^{-10} erros de replicação por base de DNA por divisão celular, cada espermatogônia diplóide, que contém 6×10^9 pares de bases de DNA, acumulará cerca de uma mutação nova a cada vez que se replica antes da meiose. Como um exemplo, cada espermatozóide de um homem de 27 anos é o produto de cerca de 300 ciclos de replicação e, portanto, cada espermatozóide conterá cerca de $3 \times 10^2 \times 6 \times 10^9 \times 10^{-10} = 180$ mutações novas resultantes de erros de replicação do DNA. Embora a grande maioria destas mutações não vá ser deletéria (ou vá ser recessiva ou letal ao espermatozóide e, portanto, não aparente fenotipicamente em uma concepção resultante e nascimento), algumas serão. De acordo com as taxas calculadas de mutações deletérias em loci individuais, podemos estimar que *aproximadamente 1 em 10 espermatozóides tem uma nova mutação deletéria*.

Como o DNA no espermatozóide sofreu mais ciclos de replicação que o DNA nos ovócitos, podemos esperar que as mutações que surgem de erros de replicação possam ser mais freqüentemente paternas que maternas quanto à origem. Além disso, quanto mais idoso o homem, mais ciclos de replicação precederam as divisões meióticas e, portanto, podemos esperar que a freqüência de novas mutações paternas aumente com a idade do pai. Na verdade, um excesso de mutações gênicas de origem paterna tem sido observado para alguns distúrbios, notadamente a **neurofibromatose**, a **acondroplasia** e a **hemofilia B** (na qual o avô materno é a fonte de uma mutação nova). Em outras doenças, entretanto, as novas mutações não são com mais freqüência de origem paterna, e, mesmo quando há uma tendenciosidade para uma origem paterna, nem sempre há um aumento na taxa de mutação com o avanço da idade paterna. O motivo pelo qual as mutações em alguns distúrbios apresentam uma tendenciosidade de origem parental ou um efeito de idade, enquanto outras não, ainda é ignorado.

Nos distúrbios de repetição de trinucleotídeos (ver Cap. 12), um acentuado efeito de origem parental é bem conhecido. Por exemplo, as grandes expansões da repetição CAG que causam a doença de Huntington juvenil geralmente são de origem paterna. Por outro lado, as grandes expansões da repetição CGG na síndrome do X frágil quase sempre ocorrem durante a gametogênese feminina. Tais diferenças podem ser devidas a diferenças biológicas fundamentais entre a ovocitogênese e a espermatogênese, mas também podem resultar de seleção contra gametas portadores de expansões repetidas, como foi mostrado para espermatozóides portadores de expansões muito grandes da repetição CGG associadas à síndrome do X frágil.

Mutações Somáticas e Câncer

As mutações podem ocorrer em qualquer célula, tanto nas células da linhagem germinativa quanto nas somáticas. Apenas as mutações da linhagem germinativa são transmitidas de uma geração para a seguinte e são as responsáveis pelas doenças hereditárias. Isto não significa, entretanto, que as mutações de células somáticas não sejam medicamente importantes. Na verdade, a grande maioria das divisões celulares que produzem um organismo adulto com cerca de 10^{14} células a partir de uma única célula, o zigoto, ocorre nas linhagens somáticas. Conseqüentemente, a maioria das mutações ocorre nas células somáticas. Considerando-se uma freqüência de 10^{-10} erros de replicação por base do DNA por divisão celular e uma estimativa de 10^{15} divisões celulares durante a vida de um adulto, os erros de replicação resultam em milhares de novas mutações no genoma em cada célula do organismo. A magnitude geral da carga mutacional é obviamente enorme. A grande maioria das mutações ocorre nas células somáticas e, portanto, não é herdável. Dependendo da natureza da mutação, entretanto, sua localização no genoma e o tecido envolvido, o efeito fenotípico de uma mutação somática pode ter um impacto devastador no indivíduo, caso leve ao câncer. Mutações cromossômicas tais como translocações e inversões são responsáveis por muitas formas de **leucemia** e **linfoma maligno**. As mutações em genes somáticos são tidas como estando implicadas na maioria — se não em todas — das formas de câncer. Por exemplo, sabe-se que a maioria dos casos de **câncer colorretal** em adultos, de **retinoblastoma** e de **tumor de Wilms** em crianças, apenas para citar algumas, são resultantes de mutações gênicas somáticas. Neste sentido, o câncer é fundamentalmente uma doença "genética", e as mutações são centrais à sua etiologia ou progressão, como apresentado no Cap. 16.

Defeitos Generalizados no Reparo do DNA

Como se poderia esperar em função do importante papel que a replicação do DNA e as enzimas de reparo têm na vigilância e na prevenção de mutações, os defeitos herdados que alteram o funcionamento de tais enzimas podem levar a um aumento acentuado na freqüência de mutações de todos os tipos. Os distúrbios autossômicos recessivos, tais como o **xeroderma pigmentoso**, a **ataxia telangiectasia**, a **anemia de Fanconi** e a **síndrome de Bloom**, são decorrentes da perda de função de proteínas necessárias ao reparo ou à replicação normal do DNA. Os pacientes com estas condições têm uma alta freqüência de mutações cromossômicas e gênicas, o que predispõe as pessoas afetadas ao câncer (ver Caps. 9 e 16). Os pacientes com **câncer de cólon não-polipose hereditário**, um câncer de cólon familiar autossômico dominante, são heterozigotos para uma cópia anormal de uma classe de genes necessários ao reparo de pareamentos errados de bases introduzidos durante a replicação ou o reparo do DNA. Se a outra cópia normal restante do gene for perdida ou mutada em uma célula epitelial intestinal, a célula não terá a capacidade de reparar os pareamentos errados de bases do DNA, as mutações gênicas se acumularão e a célula se tornará cancerosa (ver Cap. 16).

DIVERSIDADE GENÉTICA HUMANA

A maioria das estimativas das taxas de mutação descritas envolve a detecção das mutações deletérias com um efeito óbvio sobre o fenótipo. Muitas mutações, entretanto, não são deleções, mas são tidas como sendo seletivamente neutras. Com base na informação já apresentada neste capítulo, cada novo zigoto seria esperado contendo cerca de 100 mudanças de pares de bases não presentes no genoma de um dos genitores. A maioria destas variações não está na seqüência codificante, mas sim em seqüências extragênicas ou em regiões não-codificantes dos cromossomos. Durante o curso da evolução, o constante influxo de novas variações de nucleotídeos garantiu um alto grau de diversidade genética e individualidade. Este tema abrange todos os campos da genética humana e médica. A diversidade genética pode se manifestar como mudanças nos padrões de coloração dos cromossomos (ver Cap. 9), como variação de proteínas, como mudanças de nucleotídeos no DNA ou como doença.

O Conceito de Polimorfismo Genético

Quando a seqüência exatamente da mesma região do DNA situada em uma certa posição de um cromossomo é determinada em um grande número de cromossomos portados por muitas pessoas diferentes no mundo, um nível marcantemente alto de similaridade é observado. Na verdade, qualquer segmento específico do DNA humano com cerca de 1.000 pares de bases de tamanho contém, em média, apenas um par de bases que varia entre dois indivíduos na população. Como já vimos antes, diferentes versões de uma certa seqüência de DNA em um determinado local cromossômico (**locus**) são chamadas de **alelos**. Quando os alelos são tão comuns que são encontrados em mais de 1% dos cromossomos na população em geral, os alelos constituem o que é conhecido como um **polimorfismo genético**. Em contraste, os alelos com freqüências de menos de 1% são, por convenção, chamados de **variantes raras**. Alguns alelos representam uma mudança na seqüência de DNA situada entre os genes ou dentro dos íntrons e não têm conseqüência para o funcionamento de qualquer gene, podendo ser detectados apenas pela análise direta do DNA. Outras mudanças de seqüência estão situadas na seqüência codificante dos próprios genes e podem resultar em variantes proteicas diferentes, que podem levar, por sua vez, a fenótipos nitidamente distintos. A maioria (mas não todas) das mutações deletérias que levam a uma doença genética é de variantes raras. Os alelos mutantes que levam a doenças genéticas graves em geral são apenas a forma mais óbvia de diversidade genética. Ao exame, muitas proteínas foram encontradas em populações diferentes sob formas distinguíveis relativamente comuns.

Embora todo polimorfismo seja, em última análise, o resultado de diferenças na seqüência de DNA, alguns loci polimórficos foram estudados examinando-se a variação nas proteínas codificadas pelos alelos em vez de examinando-se as diferenças na seqüência de DNA dos próprios alelos. Discutiremos mais adiante, em detalhes, alguns polimorfismos de significado médico: os grupos sanguíneos ABO e Rh, importantes na determinação da compatibilidade para transfusões de sangue e, em algum grau, para o transplante de tecidos, e o sistema de alfa$_1$-antitripsina sérica (α_1-AT), implicado em uma grave doença pulmonar. Estudar a variação nas proteínas em vez de estudar o DNA que as codifica tem uma utilidade real: afinal, é o produto proteico de um alelo polimórfico, e não a própria mudança da seqüência de DNA, que em geral é responsável por fenótipos diferentes e, portanto, provavelmente dita como algumas variações genéticas afetam a interação do indivíduo com o ambiente. Os alelos polimórficos em regiões reguladoras também podem ser importantes na determinação do fenótipo, afetando a regulação transcricional dos genes.

Avalia-se que qualquer pessoa tem a possibilidade de ser heterozigota para alelos que determinam polipeptídeos estruturalmente diferentes em cerca de 20% de todos os loci. Quando comparamos pessoas de grupos étnicos diferentes, e mesmo frações maiores de proteínas, observamos que elas exibem polimorfismos detectáveis. Assim, um grau marcante de individualidade bioquímica existe dentro da espécie humana em sua constituição de enzimas e outros produtos gênicos. Além disso, como os produtos de muitas das vias bioquímicas codificadas interagem, podemos concluir que cada pessoa, independente de seu estado de saúde, tem uma constituição única geneticamente determinada e, portanto, responde de modo único a influências ambientais, dietéticas e farmacológicas. Este conceito de **individualidade química**, destacada pela primeira vez há um século pelo brilhante médico inglês *Sir* Archibald Garrod, permanece verdadeiro até hoje.

VARIAÇÃO HERDADA E POLIMORFISMO EM PROTEÍNAS

Grupos Sanguíneos e seus Polimorfismos

Os primeiros casos de variação proteica geneticamente determinada foram detectados em antígenos encontrados no sangue, os chamados **antígenos de grupos sanguíneos**. São conhecidos vários polimorfismos existentes nos componentes do sangue humano, especialmente nos antígenos ABO e Rh das hemácias (Quadro 6.3). Em particular, os sistemas ABO e Rh são importantes na transfusão de sangue, no transplante de tecidos e de órgãos e no tratamento da doença hemolítica do neonato.

O Sistema ABO

Landsteiner e colaboradores descobriram que o sangue humano podia ser classificado em quatro tipos, de acordo com a presença de dois antígenos, A e B, na superfície das hemácias e a presença de dois anticorpos correspondentes, anti-A e anti-B, no plasma.

Existem quatro fenótipos principais: O, A, B e AB. As pessoas do tipo A têm antígeno A em suas hemácias, as do tipo B têm antígeno B, as pessoas AB têm os antígenos A e B e as pessoas do tipo O não têm nenhum dos dois. Uma característica dos grupos ABO que não é compartilhada pelos outros sistemas de grupo sanguíneo é a relação recíproca, em um indivíduo, entre os antígenos presentes nas hemácias e os anticorpos no soro. Quando as hemácias não têm o antígeno A, o soro contém anti-A; quan-

QUADRO 6–3

Genótipos ABO e Reatividade Sérica

Fenótipo da Hemácia	Reação com Anti-A	Reação com Anti-B	Anticorpos no Soro
O	−	−	anti-A, anti-B
A	+	−	anti-B
B	−	+	anti-A
AB	+	+	Nenhum

− representa sem reação; + representa reação

do as células não têm o antígeno B, o soro contém anti-B. O motivo para esta relação recíproca é incerto, mas a formação de anti-A e anti-B é tida como sendo uma resposta à ocorrência natural de antígenos similares a A e similares a B no ambiente (por exemplo, nas bactérias). A reação das hemácias de cada tipo com antisoro anti-A e anti-B é mostrada no Quadro 6.3.

Base Genética Molecular do Sistema ABO

Os grupos sanguíneos ABO são determinados por um locus no cromossomo 9. Os alelos *A*, *B* e *O* neste locus são um exemplo clássico de multialelismo no qual três alelos, dois dos quais (*A* e *B*) são co-dominantes e o terceiro (*O*) é recessivo, determinam quatro fenótipos. Os antígenos A e B são feitos pela ação dos alelos *A* e *B* em uma proteína da superfície das hemácias chamada de antígeno H. O alelo *B* codifica uma glicosiltransferase que reconhece preferencialmente o açúcar D-galactose e o adiciona à proteína H. O alelo *A* codifica uma forma um pouco diferente da enzima, que preferencialmente reconhece *N*-acetilgalactosamina em vez de D-galactose e adiciona *N*-acetilgalactosamina ao precursor, criando, assim, o antígeno A. Um terceiro alelo, *O*, codifica uma versão mutante da transferase que não tem atividade de transferase e não afeta detectavelmente a substância H. A especificidade antigênica é, portanto, conferida por qual açúcar terminal específico, se é que algum, é adicionado.

As diferenças moleculares no gene de glicosiltransferase que são responsáveis pelos alelos *A*, *B* e *O* já foram determinadas. São encontradas quatro diferenças de seqüência de nucleotídeos entre os alelos *A* e *B* que resultam em mudanças de aminoácidos que alteram a especificidade da glicosiltransferase codificada pelo gene *ABO*. O alelo *O* tem uma deleção de um único par de bases na região codificante do gene *ABO*, que causa uma mutação de mudança de matriz de leitura, a qual elimina a atividade de transferase nas pessoas do tipo O. Agora que as seqüências de DNA estão disponíveis, a tipificação do grupo sanguíneo ABO está sendo feita diretamente no genótipo em vez de no fenótipo, especialmente quando existem dificuldades técnicas na análise serológica, como em geral é o caso nas investigações forenses ou de teste de paternidade.

A principal importância médica do grupo sanguíneo ABO é na transfusão de sangue e no transplante de tecidos ou de órgãos. No sistema do grupo sanguíneo ABO, existem combinações compatíveis e incompatíveis. Uma combinação compatível é uma na qual as hemácias de um doador não levam o antígeno A ou B que corresponde aos anticorpos no soro do receptor. Embora teoricamente existam doadores universais (grupo O) e receptores universais (grupo AB), um paciente recebe sangue de seu próprio grupo ABO, exceto em emergências. A presença regular de anti-A e anti-B explica a falha de muitas das tentativas iniciais em transfundir sangue, pois estes anticorpos podem causar a destruição imediata de células ABO incompatíveis. Nos transplantes de tecidos ou órgãos, a compatibilidade ABO do doador e do receptor, bem como a compatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA) (descrita no Cap. 14), é essencial para a sobrevida do enxerto.

O Sistema Rh

O sistema Rh, juntamente com o sistema ABO, também tem importância clínica em função de seu papel na doença hemolítica do neonato e nas incompatibilidades de transfusão. O nome Rh vem dos macacos Rhesus, que foram usados nos experimentos que levaram à descoberta do sistema. Em termos simples, a população é separada em indivíduos Rh-positivos, que expressam em suas hemácias o antígeno Rh-D, um polipeptídeo codificado por um gene no cromossomo 1, e indivíduos Rh-negativos, que não expressam este antígeno. O fenótipo Rh-negativo em geral se origina da homozigose para um alelo não-funcional do próprio gene *Rh-D*. A freqüência de indivíduos Rh-negativo varia muito em grupos étnicos diferentes. Por exemplo, 17% dos ingleses são Rh-negativo, enquanto a freqüência entre os japoneses é de 0,5%.

Doença Hemolítica do Neonato. Clinicamente, o principal significado dos sistema Rh é que as pessoas Rh-negativo podem formar rapidamente anticorpos anti-Rh após a exposição a hemácias Rh-positivo. Isto é especialmente um problema quando uma grávida Rh-negativo porta um feto Rh-positivo. Normalmente, durante a gravidez, pequenas quantidades de sangue fetal cruzam a barreira placentária e atingem a corrente sanguínea materna. Se a mãe for Rh-negativo e o feto for Rh-positivo, a mãe formará anticorpos que voltam para a circulação fetal e danificam as hemácias fetais, causando doença hemolítica do neonato, com conseqüências que podem ser graves, caso não sejam tratadas.

A descoberta do sistema Rh e seu papel na doença hemolítica do neonato foi uma contribuição importante da genética para a medicina. Já tendo sido a doença genética humana mais comum, a doença hemolítica do neonato hoje é relativamente rara em função de medidas preventivas que se tornaram prática rotineira na medicina obstétrica. Quando meninas ou mulheres Rh-negativo de idade reprodutiva precisam de transfusões, elas devem receber apenas sangue Rh-negativo. Nas mulheres grávidas Rh-negativo, o risco de imunização por hemácias fetais Rh-positivo pode ser minimizado com injeções de imunoglobulina Rh durante e após a gestação ou após o término da gestação, para eliminar qualquer célula Rh-positivo da circulação materna antes que ela faça uma resposta imune.

A maioria dos casos de doença hemolítica do neonato reconhecidos clinicamente se deve à incompatibilidade de Rh, mas a incompatibilidade de ABO também pode ocorrer e, embora difícil de diagnosticar, ela tende a ser branda e a não precisar de tratamento.

Polimorfismo de Proteínas do Soro: Deficiência de Alfa$_1$-Antitripsina

A α_1-AT é uma importante proteína do soro que inibe a atividade de várias enzimas proteolíticas específicas, tais como a tripsina, a quimotripsina e a elastase pancreática. Seu principal alvo é a elastase leucocitária, uma enzima que, se não for inativada pela α_1-AT, destrói as proteínas do tecido conjuntivo pulmonar (particularmente a elastina), levando a danos da parede alveolar. A deficiência de α_1-AT causa um enfisema muito grave, de início precoce. O gene para a α_1-AT está no cromossomo 14 e é altamente polimórfico: existem vários alelos relativamente comuns, com freqüências de 10% a 75% em populações diferentes, e cerca de 25 alelos raros (Quadro 6.4). Cada um dos três alelos mais comuns (*M1*, *M2* e *M3*) codifica uma versão estruturalmente diferente de uma proteína funcionalmente normal, como o fazem alguns dos alelos raros. Alguns alelos causam a doença porque codificam moléculas de α_1-AT com atividade inibidora de protease clinicamente muito reduzida. Outros o fazem porque sua secreção pelo fígado está prejudicada e a α_1-AT anormal acumula-se nos hepatócitos.

QUADRO 6–4

Alelos Selecionados no Locus de Alfa$_1$-Antitripsina em Populações Diferentes

População	Freqüências Alélicas					
	M1	*M2*	*M3*	*S*	*Z*	Outra
Caucasianos nos EUA	0,724	0,137	0,095	0,023	0,014	0,007
Afro-americanos	0,981	–	–	0,015	0,004	–
Dinamarca	0,728	0,136	0,082	0,022	0,023	0,009
Portugal	0,510	0,260	0,053	0,150	0,009	0,018
China (média de 5 populações)	0,709	0,209	0,070	–	–	0,012
Japão	0,785	0,153	0,062	–	–	–

Baseado em dados resumidos por Cox D. W. (2000) α_1-Antitrypsin deficiency. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª ed. McGraw-Hill, New York

O principal significado médico do polimorfismo de α_1-AT está nos alelos cujos produtos levam a uma deficiência da atividade da α_1-AT no soro. O mais comum e mais importante deles é o alelo *Z*, que tem uma freqüência de 1% a 2% nas populações caucasianas. As pessoas com o genótipo *Z/Z* têm menos de 15% da concentração normal no plasma de α_1-AT e têm um alto risco de doença pulmonar obstrutiva no início da vida adulta, como discutiremos em detalhes no Cap. 12. A deficiência de α_1-AT é vista com uma freqüência de 1/2.000 a 1/8.000 nas populações caucasianas, mas apenas raramente nas populações afro-americanas ou asiáticas.

O polimorfismo genético no locus de α_1-AT leva a uma variação de várias vezes na atividade da enzima entre pessoas aparentemente "normais". Parte desta variação pode ser altamente significativa do ponto de vista de saúde pública, pois há uma sugestão de predisposição a vários distúrbios, tais como doença pulmonar (particularmente em fumantes), asma e artrite reumatóide (bem como outros distúrbios imunes) entre as pessoas heterozigotas para o alelo *Z* ou *S* (estimada como de aproximadamente 3% a 5% da população caucasiana).

VARIAÇÃO HERDADA E POLIMORFISMO NO DNA

A seção anterior concentrou-se nas mutações e nos polimorfismos em partes do genoma que codificam proteínas, estimadas como 5% do DNA genômico total. E quanto à diversidade nos 95% restantes do genoma humano? Nos grandes levantamentos nos quais foram seqüenciados os mesmos segmentos de DNA de muitas pessoas, como já mencionado, a proporção total de posições de bases polimórficas foram estimadas como sendo de cerca de 1 em 1.000 pares de bases para qualquer trecho de DNA escolhido aleatoriamente no genoma. Este dado é cerca de 2,5 vezes mais alto que a proporção de nucleotídeos heterozigotos estimados para regiões codificantes de proteínas do genoma (cerca de 1 em 2.500 pares de bases). A diferença não é surpreendente, pois parece intuitivamente provável que as regiões codificantes de proteínas estejam sob uma pressão seletiva mais rígida e, assim, a incidência de mutações nestas regiões durante a evolução deve ser mais baixa.

Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição

As enzimas de restrição têm seqüências específicas de reconhecimento no DNA (ver Cap. 4) e, conseqüentemente, as mudanças no DNA genômico levam à criação ou à eliminação de determinados sítios de clivagem, alterando, assim, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA que surgem após a transferência de Southern e a hibridização com uma sonda de DNA clonado (Fig. 6.3). Logo após a aplicação da transferência de Southern para análise genômica no final da década de 1970, descobriu-se que nem todas as pessoas têm exatamente a mesma distribuição

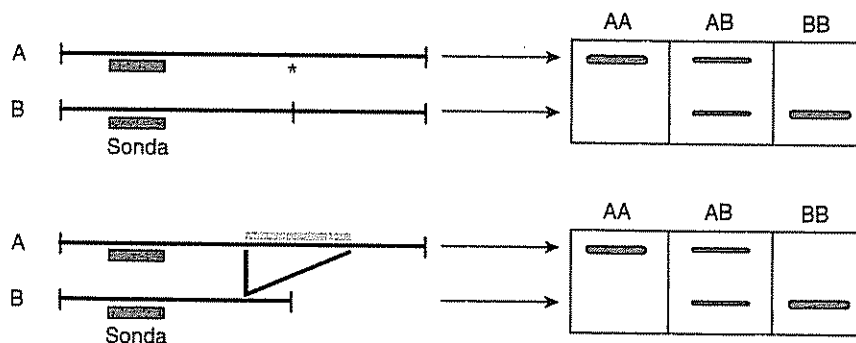



Fig. 6.3 Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) detectados por hibridização de DNA (transferência de Southern). Em cima, o polimorfismo deve-se à variação em um sítio específico de clivagem para uma enzima de restrição; no alelo *A*, o sítio está ausente (*asterisco*) e o fragmento de restrição resultante detectado pela sonda é maior que no alelo *B*. Na parte de baixo, o polimorfismo deve-se à inserção (alelo *A*) ou à deleção (alelo *B*) de um segmento do DNA (*barra cinza*) dentro de um determinado fragmento de restrição detectado pela sonda. Para ambos os tipos de polimorfismo são indicados os padrões de transferência de Southern observados no DNA de pessoas com os três genótipos possíveis neste locus.

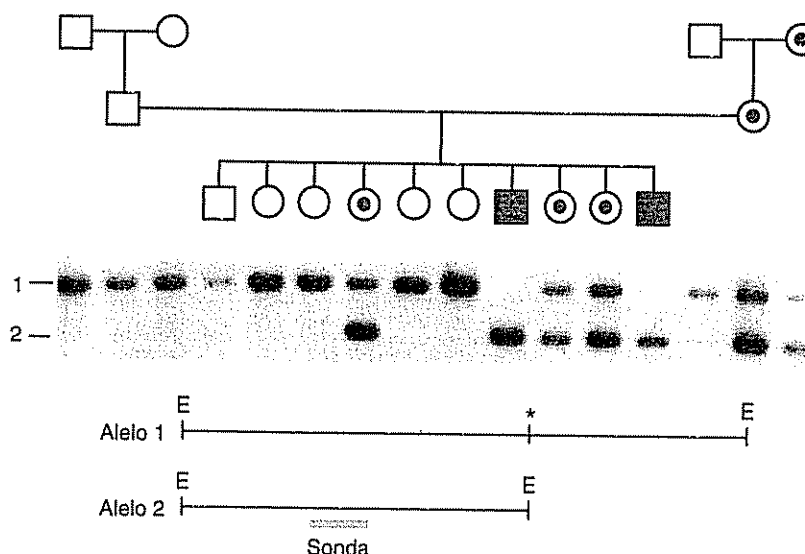



Fig. 6.4 Herança co-dominante de um polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) ligado ao X. Os alelos 1 e 2 diferem pela variação em um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Eco*R1 (E). Os símbolos vermelhos indicam a herança do alelo 2.

de sítios de enzima de restrição. Embora a existência de alguma variação de nucleotídeos pudesse ser prevista pelo que se sabia sobre mutação e polimorfismos de proteína, o grau de variação detectado pela transferência de Southern foi uma surpresa.

As variações no DNA nos sítios de restrição detectadas pela transferência de Southern são chamadas de **polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs)**. Os diferentes comprimentos de fragmentos de restrição constituem alelos co-dominantes em um locus de DNA (ver Fig. 6.3). Assim, podemos facilmente examinar uma transferência de Southern e ler diretamente todos os diferentes comprimentos de fragmentos como um reflexo do genótipo (a seqüência de DNA) em um determinado sítio de restrição (Fig. 6.4). Os RFLPs também podem surgir de deleções ou inserções de DNA em vez de mudanças de nucleotídeos únicos. Se um segmento de DNA entre dois sítios de restrição for deletado ou inserido, o tamanho do fragmento de restrição resultante será diferente (ver Fig. 6.3).

Os RFLPs devidos a mudanças em determinados sítios de clivagem de endonuclease são um pequeno subgrupo de uma classe mais geral de polimorfismo, conhecida como **polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)**. Os modernos métodos de detecção de seqüências de DNA permitem a detecção de qualquer SNPs e não apenas daqueles que alteram um sítio de enzima de restrição. Os SNPs são várias ordens de magnitude mais freqüentes que os VNTRs ou polimorfismos de microssatélites (ver adiante) e são uniformemente distribuídos por todo o genoma. Estas características os tornam excelentes marcadores para gerar mapas genéticos bem densos (ver Cap. 8), tais como os necessários para avaliar a contribuição potencial de um determinado gene para um distúrbio complexo (ver Cap. 15). Os RFLPs (e os SNPs de modo mais geral) usualmente têm apenas dois alelos correspondendo a duas bases diferentes que ocupam uma determinada posição.

A descoberta dos SNPs aumentou muito a extensão do reconhecimento de quais cópias individuais de determinados genes

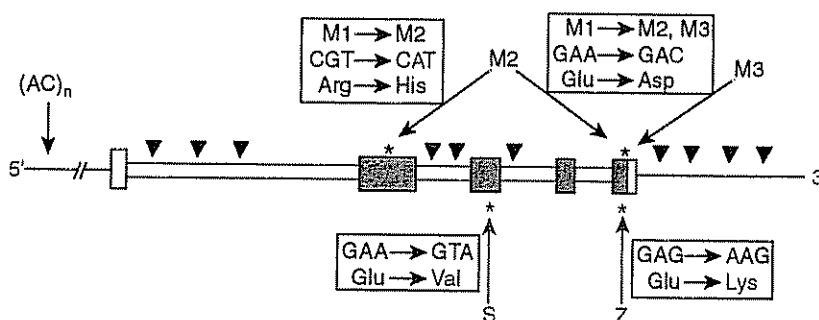



Fig. 6.5 Esquema do gene de α_1-AT e a localização dos sítios polimórficos de DNA, variantes proteicas normais e duas mutações de doença no gene e ao redor dele. Os éxons estão em boxes e os éxons codificantes estão em vermelho. Os triângulos pretos indicam sítios de polimorfismos de um nucleotídeo, cada um consistindo em dois alelos situados em partes não-codificantes do gene. Os asteriscos pretos acima do gene indicam os sítios de mutações em éxons resultantes nos alelos *M2* e *M3*, enquanto os asteriscos vermelhos abaixo do gene são mutações em éxons resultantes nos alelos *S* e *Z*, respectivamente. As mutações no DNA e as substituições de aminoácidos nos alelos *M2*, *M3*, *S* e *Z* são indicadas. Notar que o alelo *M2* tem uma mutação em comum com o alelo *M3* no éxon 5, bem como uma no éxon 2. A posição de um locus de microssatélite altamente polimórfico $(AC)_n$ com 18 alelos diferentes é mostrada na região flanqueadora 5'.

são verdadeiramente únicas Em termos conceituais, entretanto, os polimorfismos de DNA não são novidade. Eles são simplesmente a manifestação molecular da variação no genoma que há muito é aparente pelos estudos dos polimorfismos de proteínas.

Como ilustração, considere novamente a variação no locus de α_1-AT. Como já foi discutido antes e apresentado no Quadro 6.4, um amplo polimorfismo já foi documentado no nível da proteína nos estudos populacionais e nos estudos de pacientes com deficiência herdada de α_1-antitripsina. Um grau similar de variação de seqüência é indicado pela análise de DNA no locus de α_1-AT. A Fig. 6.5 mostra a estrutura do gene de α_1-AT, incluindo as posições e as freqüências de alguns dos sítios mais comuns de variação do DNA: os SNPs (identificados originalmente como RFLPs), um locus polimórfico de microssatélite no DNA 5′ flanqueador, duas variantes normais na região codificante do gene e duas mutações patológicas. Observe na Fig. 6.5 que as mutações de uma só base responsáveis pelos SNPs, situadas nos íntrons ou no DNA flanqueador, são conceitualmente idênticas às mudanças responsáveis pelos alelos normais *M2* e *M3*, bem como pelos alelos patológicos *Z* e *S* vistos nos pacientes com deficiência de α_1-AT. As únicas diferenças entre os vários tipos de polimorfismos residem em suas freqüências alélicas, sua localização dentro do gene e suas conseqüências patológicas, se é que alguma.

Polimorfismos de Minissatélite e Microssatélite

Polimorfismos de VNTR

Alguns RFLPs são baseados na inserção ou deleção de uma quantidade variável de DNA em vez de na perda ou no ganho de um sítio de reconhecimento de endonuclease de restrição. Por exemplo, uma classe especial de polimorfismos resulta da inserção, em tandem, de múltiplas cópias de uma seqüência de DNA com 10 a 100 pares de bases de tamanho, conhecida como **minissatélite**, no DNA entre dois sítios de restrição. Esta classe de RFLP, conhecida como um polimorfismo de **número variável de repetições em tandem (VNTR)**, é caracterizada por muitos alelos (Fig. 6.6), pois o tamanho de um fragmento de restrição contendo seqüências de minissatélite difere dependendo de quantas cópias do minissatélite estejam presentes. Os marcadores mais informativos têm várias dúzias ou mais alelos e, assim, nenhum par de indivíduos não-aparentados tem probabilidade de compartilhar os mesmos alelos.

As seqüências minissatélite repetidas encontradas em muitos polimorfismos diferentes do tipo VNTR em geral são suficientemente similares para possibilitar a detecção simultânea de muitos loci diferentes usando um fragmento de minissatélite como sonda em uma única hibridização de transferência de Sou-

Fig. 6.6 Herança co-dominante de um polimorfismo de DNA autossômico hipervariável causada por um número variável de repetições em tandem (VNTR). Os alelos de 1 a 4 estão relacionados por um número variável de curtas seqüências de DNA idênticas (ou quase) (*setas*). A variação de tamanho pode ser detectada após digestão com enzimas de restrição e hibridização com uma só sonda, que fica fora das próprias seqüências VNTR, mas dentro dos sítios de restrição usados para definir os fragmentos alélicos. (Foto original por cortesia de A. Bowcock, Washington University, St Louis.)

Fig. 6.7 *Fingerprinting* de DNA de gêmeos por meio de uma sonda que detecta polimorfismos do número variável de repetições em tandem (VNTR) em muitos loci pelo genoma. Cada par de colunas contém DNA de um par de gêmeos. Os gêmeos do primeiro par (bem como os gêmeos do terceiro par) têm *fingerprints* idênticos de DNA, o que indica que são gêmeos idênticos (monozigóticos). O conjunto do meio tem *fingerprints* claramente diferentes, o que indica que são gêmeos fraternos. (Transferência de Southern fornecida por cortesia de Alec Jeffreys, Universidade de Leicester, Reino Unido.)

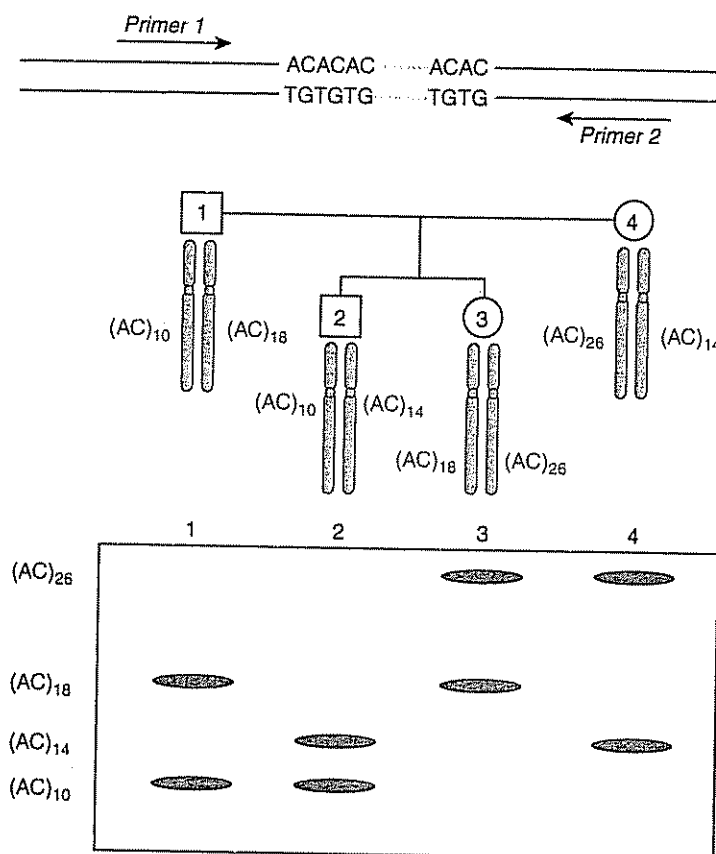



Fig. 6.8 Marcadores microssatélite em DNA humano. Em cima, o DNA contendo um marcador microssatélite $(AC)_n$ em um cromossomo. Os *primers* 1 e 2 são *primers* da reação em cadeia da polimerase (PCR) complementares a seqüências únicas flanqueadoras da repetição de dinucleotídeo. No meio, um heredograma demonstrando a herança co-dominante de um polimorfismo de microssatélite devido a números variáveis do dinucleotídeo AC. O genótipo de cada indivíduo é mostrado abaixo de seu símbolo no heredograma. Os fragmentos de tamanhos diferentes são amplificados usando PCR e os *primers* 1 e 2 flanqueadores do trecho de dinucleotídeos AC e seus tamanhos relativos são determinados pela separação deles usando eletroforese em gel.

thern. Apenas os gêmeos idênticos apresentam um padrão indistinguível (Fig. 6.7) e, portanto, a detecção simultânea de vários polimorfismos de VNTR tem sido chamada de **DNA *fingerprinting***. Os VNTR marcadores foram amplamente superados pelos marcadores microssatélite (ver adiante) para a análise de ligação genética (ver Cap. 8), mas ainda são muito usados para a identificação individual, como na comparação do DNA de um suspeito com o de uma pessoa que cometeu um crime, a identificação dos restos de vítimas de crime e de pessoal militar e os testes de paternidade.

Marcadores Microssatélite

Mais freqüentes e polimórficos que os loci minissatélites de VNT são o loci de **microssatélites**. Os microssatélites são trechos de DNA que consistem em unidades repetidas de dois, três ou quatro nucleotídeos, tais como TGTG...TG, CAACAA... CAA ou AAATAAAT...AAAT. O número de unidades de nucleotídeos repetidos contidos dentro de qualquer microssatélite pode diferir entre os dois cromossomos homólogos de uma pessoa e entre pessoas na população. Um determinado microssatélite é, portanto, um locus polimórfico, e os diferentes números de unidades repetidas em um determinado microssatélite constituem os alelos deste locus. Três características de marcadores microssatélites os tornam muito úteis para os estudos de ligação genética (ver Cap. 8). Primeiro, um locus de microssatélite em geral tem muitos alelos (tamanhos de repetição) presentes na população, criando a probabilidade de que uma pessoa seja heterozigota em geral em mais de 70% (ver o Cap. 8 para uma discussão da importância de ser heterozigoto para os estudos de ligação). Segundo, ao contrário das análises de RFLP ou VNTR, a genotipagem dos alelos de microssatélite não requer o uso das técnicas de transferência de Southern. O uso de *primers* de PCR complementares a seqüências únicas de DNA flanqueadoras de microssatélites gera fragmentos que diferem em tamanho dependendo de quantas repetições estejam presentes (Fig. 6.8). Finalmente, dezenas de milhares de loci polimórficos de microssatélites já foram identificados ao longo do genoma humano, de modo que quase nenhuma região do genoma não pode ser mapeada pelos métodos de ligação genética usando estes marcadores.

USOS DE POLIMORFISMOS EM GENÉTICA MÉDICA

Os polimorfismos são elementos importantes em todas as pesquisas de genética humana. A habilidade de distinguir formas herdadas diferentes de um gene ou segmentos diferentes do genoma fornecem ferramentas que são cruciais para uma ampla gama de aplicações. Temos testemunhado uma explosão do nú-

mero e da utilidade de polimorfismos de DNA. Como ilustrado nos capítulos subseqüentes, os marcadores genéticos são de enorme uso prático em genética médica para o seguinte: mapeamento de um gene em uma determinada região de um cromossomo pela análise de ligação (ver Cap. 8); diagnóstico pré-natal de doenças genéticas (ver Cap. 18); detecção de portadores heterozigotos de doenças genéticas (ver Cap. 19); avaliação de pessoas com risco alto e baixo com predisposição a distúrbios adultos comuns, tais como doença coronariana, câncer e diabetes (ver Cap. 15); teste de paternidade e aplicações forenses na identificação de restos de vítimas de crime ou comparação do DNA de um suspeito de crime; e tipagem tissular para transplante de órgãos.

Referências Gerais

Crow JF, Denniston C (1985) Mutation in human populations. Adv Hum Genet 14:59–124.

Harris H (1980) The Principles of Human Biochemical Genetics, 3rd ed. Elsevier-North Holland, Amsterdam.

Vogel F, Motulsky AG (1997) Human Genetics, 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Antonarakis SE (1998) Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. Hum Mutat 11:1–3.

Cox DW (2000) α_1-Antitrypsin deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Dunnen JT and Antonarakis SE (2000) Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. Hum Mutat 15:7–12.

Gardner RJ (1977) A new estimate of the achondroplasia mutation rate. Clin Genet 11:31–38.

Jeffreys AJ (1993) DNA typing: Approaches and applications. J Forensic Sci Soc 33:204–211.

Lowe JB (1994) Red cell membrane antigens. *In* Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H (eds) Molecular Basis of Blood Diseases, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, pp 293–330.

Sheffield VC, Weber JL, Buetow KH, et al (1995) A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genome-wide linkage maps. Hum Mol Genet 4:1837–1844.

Wang DG, Fan J, Siao C, et al (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science 280:1077–1082.

Weber JL (1990) Informativeness of human $(dC\text{-}dA)_n \cdot (dG\text{-}dT)_n$ polymorphisms. Genomics 7:524–530

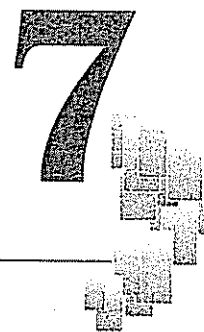
URLs *para Bancos de Dados de Mutações Humanas*

Human Genome Organization (HUGO) database
http://ariel.ucs.unimelb.au:80/~cotton/mdi.htm

Institute of Medical Genetics in Cardiff
http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html

Bancos de dados de mutações em centenas de genes diferentes de doenças. Ambos incluem *links* para bancos de dados de mutações específicas de locus e específicas de doenças mantidos por pesquisadores de todo o mundo

Problemas

1. Dentre 4,5 milhões de nascimentos em uma população durante um período de 40 anos, 41 crianças diagnosticadas com a condição autossômica dominante aniridia nasceram de genitores normais. Supondo que estes casos foram devidos a mutações novas, qual a taxa de mutação estimada no locus de aniridia? Em que suposições esta estimativa é baseada e por que esta estimativa pode ser muito alta ou muito baixa?
2. Os seguintes padrões são observados para um polimorfismo de DNA após digestão de DNA genômico com uma determinada enzima de restrição. Em homens, um fragmento de 9 ou 11 kb; em mulheres, um fragmento de 9 ou 11 kb, ou ambos
   (a) Qual a provável origem destes padrões?
   (b) O que seria previsto se as amostras de DNA fossem digeridas com uma enzima de restrição diferente?
3. Um polimorfismo de DNA tipo VNTR detecta cinco alelos diferentes, cada um com uma freqüência de 0,20. Que proporção de indivíduos se poderia esperar como sendo heterozigota para este locus?
4. Uma mulher que é Rh negativo casa-se com um homem Rh positivo. Os filhos correm risco neonatal de doença hemolítica? Se os filhos correm risco, este risco de doença é maior ou menor durante a primeira gestação ou nas gestações subseqüentes? A doença pode ser evitada? E se o homem também fosse Rh negativo?

Variação Genética em Populações

Em genética, mais que em qualquer outra especialidade médica, o paciente é um reflexo da família e da população à qual pertence. A genética médica está envolvida não só em fazer o diagnóstico correto em um caso particular, mas também em determinar os genótipos de outros membros familiares e avaliar os riscos de recorrência tanto para os genitores de uma pessoa afetada quanto para seus irmãos e irmãs, e também para os parentes mais distantes. Saber sobre os diferentes genes de doenças que são comuns em populações diferentes e sobre seu papel na saúde e na doença pode ser um ponto valioso no diagnóstico clínico e na consulta genética. A genética é única entre as várias disciplinas na medicina em função de sua ênfase tanto no paciente individualmente quanto na família.

A **genética de populações** é o estudo da distribuição dos genes nas populações e de como as freqüências dos genes e genótipos são mantidas ou alteradas. A genética de populações envolve tanto os fatores genéticos, tais como a mutação e a reprodução, quanto os fatores ambientais e sociais, tais como a seleção e a migração, que, em conjunto, determinam a freqüência e a distribuição das doenças genéticas nas famílias e comunidades.

Nesta seção, descreveremos o princípio subjacente à genética de populações, o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Consideraremos suas suposições e os fatores que podem causar um desvio verdadeiro ou aparente do equilíbrio em populações reais em oposição àquelas idealizadas; consideraremos, também, como determinar as freqüências e taxas de mutação de genes específicos de importância clínica, tanto autossômicos quanto ligados ao X. Finalmente, o capítulo fornecerá alguma compreensão sobre como surgem as diferenças nas freqüências gênicas entre os membros de grupos diferentes, mais ou menos isolados geneticamente.

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES HUMANAS

A espécie humana, com quase 5 bilhões de membros, é separada em muitas subpopulações distinguíveis. Embora os cromossomos humanos e os loci que eles contêm sejam idênticos na espécie, a natureza dos diferentes alelos e suas freqüências em muitos loci variam amplamente entre grupos populacionais. Algumas variantes são virtualmente restritas a membros de um único grupo, embora não estejam necessariamente presentes em todos os membros do grupo. Com mais freqüência, os alelos variantes podem ser encontrados em muitas amostras populacionais, mas têm freqüências diferentes em populações diferentes.

Os atuais estudos antropológicos sugerem que os ancestrais humanos surgiram há cerca de 1,5 milhão de anos, na África, e então se espalharam pelo resto do mundo em sucessivas ondas de migração. Pequenos grupos humanos dispersos eram geográfica e, portanto, geneticamente isolados uns dos outros e desenvolveram-se em **grupos étnicos**, com conjuntos de freqüências gênicas característicos. A seleção de mutações favoráveis em resposta a condições ambientais ou a sobrevida ao acaso de mutações específicas neutras ou mesmo prejudiciais, juntamente com um grau de isolamento reprodutivo entre os grupos, permitiram que as diferenças genéticas entre os grupos populacionais fossem estabelecidas. Em geral, existem diferenças acentuadas de freqüências alélicas entre grupos populacionais, tanto para alelos que causam doenças genéticas (Quadro 7.1) quanto para marcadores genéticos supostamente neutros em termos seletivos, tais como alguns grupos sangüíneos e polimorfismos de proteínas e alguns polimorfismos de DNA (Quadro 7.2). Embora os alelos que causam doenças genéticas sejam altamente significativos para a determinação de riscos de doenças em grupos populacionais específicos, os marcadores genéticos seletivamente neutros também são importantes como marcadores da recente evolução humana.

FENÓTIPOS, GENÓTIPOS E FREQÜÊNCIAS GÊNICAS

Obtenção das Freqüências Alélicas a Partir das Freqüências Genotípicas

Se pudéssemos conhecer o genótipo real de cada locus, em cada indivíduo e em cada família que procura a consulta genética, poderíamos fazer uma determinação altamente precisa dos riscos de recorrência. Infelizmente, em muitos casos, o genótipo responsável pela doença é desconhecido, e é apenas o fenótipo da doença que podemos observar e medir. Assim, há uma necessidade de ser capaz de usar dados de incidência para uma doença herdada ou outra característica genética para determinar a freqüência de determinados genótipos e então deduzir as freqüências dos alelos responsáveis pelos diferentes genótipos.

A Genética da Resistência ao Vírus da Imunodeficiência Humana

Um exemplo importante de uma característica autossômica comum, controlada por um único par de alelos, pode ser usa-

QUADRO 7–1

Exemplos Selecionados de Alelos de Doenças com Freqüências Diferentes em Populações Diferentes

Alelo/Doença	Variação Populacional
Alelo β^s do gene de β-globina (anemia falciforme)	Mais alta na África, menos comum em outras partes. Freqüência alélica de 1/20 entre os afro-americanos; < 1/200 entre os hispano-americanos
Alelo β^c do gene de β-globina	Alta no oeste da África (especialmente Gana e Burquina Faso), onde a freqüência alélica é de 1/6. Freqüência alélica de 1/100 entre os afro-americanos
Fibrose cística (todos os alelos da doença)	Alta nas populações européias e caucasianas dos EUA (freqüência alélica de 1/40–1/50); baixa nas populações finlandesa, asiática e africana
Fenilcetonúria (todos os alelos da doença)	Mais alta nas populações européias de origem celta e na Europa setentrional (freqüência alélica de 1/67–1/90). Freqüência alélica de 1/125 na Suíça e Itália, de 1/223 entre os afro-americanos, de 1/330 no Japão e de 1/500 na Finlândia
Doença de Tay-Sachs	Alta freqüência nos judeus Ashkenazi (freqüência alélica de 1/60); cem vezes menor em outros grupos
Hipercolesterolemia familiar	Alta em certas regiões de Quebec (freqüência alélica de 1/244) e nos africânderes na África do Sul (freqüência alélica de 1/140). Freqüência alélica de 1/1.000 na Europa e nos EUA
Distrofia miotônica	Freqüência alélica de 1/50.000 na Europa e inexistente na África sub-Saara. Freqüência alélica de 1/950 em algumas regiões de Quebec

do para ilustrar os princípios básicos que determinam as freqüências gênicas nas populações. Considere o gene *CCR5*, que codifica um receptor de citocina da superfície celular que serve como ponto de entrada para algumas linhagens do vírus da imunodeficiência humana (HIV) que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Uma deleção de 32 pares de bases neste gene resulta em um alelo (*ΔCCR5*) que codifica uma proteína não-funcional devida a uma mudança de matriz de leitura e término prematuro. As pessoas homozigotas para o alelo *ΔCCR5* não expressam o receptor em sua superfície celular e, conseqüentemente, são resistentes ao HIV. A perda de função de *CCR5* parece ser uma característica benigna e sua única conseqüência fenotípica conhecida é a resistência à infecção por HIV. O alelo normal e o alelo com deleção de 32 pares de bases, *ΔCCR5*, são facilmente distinguíveis pela análise da reação em cadeia da polimerase do gene. Uma amostra de 788 indivíduos europeus nos deu números absolutos de pessoas que eram homozigotas para ambos os alelos ou heterozigotas, como mostra o Quadro 7.3.

Com base nas freqüências genotípicas observadas, podemos determinar diretamente as freqüências alélicas simplesmente contando os alelos. Neste contexto, quando nos referimos à freqüência populacional de um alelo, estamos considerando um ***pool* de genes** como uma coleção de todos os alelos em um determinado locus para toda a população. Para loci autossômicos, o tamanho do *pool* de genes em um locus é o dobro do número de pessoas da população, pois cada genótipo autossômico consiste em dois alelos, isto é, o indivíduo *ΔCCR5/ΔCCR5* tem dois alelos *ΔCCR5* e um indivíduo *CCR5/ΔCCR5* tem um de cada. Neste exemplo, então, a freqüência observada do alelo *CCR5* é

$$\frac{(2 \times 647) + (1 \times 134)}{788 \times 2} = 0{,}906$$

Similarmente, podemos calcular a freqüência do alelo *ΔCCR5* como 0,094, seja somando o número de alelos *ΔCCR5* diretamente ($(2 \times 7) + (1 \times 134) = 148$ de um total de 1.576 alelos) seja simplesmente subtraindo a freqüência do alelo normal *CCR5*, 0,906, de 1 (portanto, a freqüência de *ΔCCR5* = 1 − 0,906 = 0,094), pois as freqüências dos dois alelos devem somar 1.

QUADRO 7–2

Exemplos de Loci Polimórficos com Freqüências Alélicas Diferentes em Populações Diferentes

Locus	Variação Alélica
Grupo sanguíneo ABO	Ampla variação; p. ex., alelo *B* comum em asiáticos, mas ausente nas populações americanas nativas
Alfa$_1$-antitripsina	As freqüências dos três principais alelos *M* variam entre as populações (p. ex., *M1* de 0,51 a 0,98; *M2* de 0 a 0,26)
Álcool desidrogenase	Três loci: *ADH1, ADH2, ADH3*. Variante de *ADH2* muito mais comum nos japoneses (90%) que nos europeus (15%)
Aldeído desidrogenase	Deficiência de *ALDH1* em 50% dos asiáticos, <5% nos norte-americanos nativos
Sistema HLA	Vários alelos em cada locus constituindo todo o complexo, com ampla variação em freqüência (ver Cap. 14)
Metabolismo de debrisoquina (CYP2D6 4-hidroxilase)	Vários alelos codificando atividades enzimáticas que variam da deficiência total ao metabolismo extremamente rápido. Uma deficiência devida à homozigose ou heterozigose composta de alelos de metabolismo muito lento é vista em 30% dos chineses de Hong Kong, 8% de caucasianos europeus e 1% das populações árabes
Atividade de lactase (intolerância à lactose)	Dois alelos principais, para atividade alta e baixa. Uma atividade baixa após o início da infância é comum nos africanos e asiáticos (freqüência alélica de 0,8-0,95) e menos comum nos europeus setentrionais e nos caucasianos dos EUA (freqüência alélica de 0,17-0,48)

QUADRO 7-3

Freqüências Genotípicas para o Alelo CCR5 Normal e o Alelo Deletado ΔCCR5

Genótipo	N.º de Pessoas	Freqüência Genotípica Relativa Observada	Alelo	Freqüências Alélicas Derivadas
CCR5/CCR5	647	0,821		
CCR5/ΔCCR5	134	0,1682	*CCR5*	0,906
ΔCCR5/ΔCCR5	7	0,0108	*ΔCCR5*	0,094
Total	788	1,000		

Dados de Martinson J. J., Chapman N. H., Rees D. C., *et al* (1997) Global distribution of the *CCR5* gene 32 basepair deletion. Nat Genet 16:100-103.

A LEI DE HARDY-WEINBERG

Como mostramos no exemplo do gene de receptor de citocina *CCR5*, podemos usar uma amostra de indivíduos de uma população para obter as estimativas da freqüência relativa dos dois alelos na população como um todo simplesmente contando os alelos em indivíduos com cada genótipo. E quanto ao contrário? Podemos calcular a proporção da população com vários genótipos uma vez que saibamos as freqüências alélicas? Obter as freqüências genotípicas a partir das freqüências alélicas não é tão direto quanto a contagem porque não sabemos antecipadamente como os alelos são distribuídos entre os homozigotos e heterozigotos. Entretanto, quando uma população atende a certas suposições, há uma relação matemática simples, conhecida como a **lei de Hardy-Weinberg**, para calcular as freqüências genotípicas a partir das freqüências alélicas. Esta lei, a pedra angular da genética de populações, foi assim designada porque Geoffrey Hardy, um matemático inglês, e Wilhelm Weinberg, um médico alemão, formularam-na independentemente em 1908.

Suponha que p seja a freqüência de um alelo A e q seja a freqüência de um alelo a no *pool* de genes e que os alelos se combinem aleatoriamente em genótipos. Ou seja, a reprodução na população é totalmente aleatória com relação aos genótipos neste locus. A chance de que dois alelos A formem um par para dar um genótipo AA é p^2, a chance de que dois alelos a se juntem para dar um genótipo aa é q^2 e a chance de ter um par com um A e um a, resultando no genótipo Aa, é $2pq$ (o fator 2 vem do fato de que o alelo A pode ser herdado da mãe e o alelo a do pai, ou vice-versa). *A primeira propriedade importante da lei de Hardy-Weinberg é que as freqüências dos três genótipos AA, Aa e aa são dadas pelos termos da expansão binomial de* $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$.

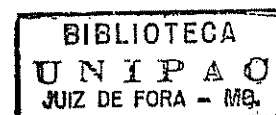
Uma segunda e crucial implicação da lei de Hardy-Weinberg é que as proporções dos genótipos não mudam de geração para geração. Isto é, as freqüências genotípicas da população permanecerão constantes, em equilíbrio, se as freqüências alélicas p e q se mantiverem constantes. Mais especificamente, quando há uma reprodução aleatória em uma população na qual os genótipos AA, Aa e aa estão presentes nas proporções $p^2{:}2pq{:}q^2$, as freqüências genotípicas na geração seguinte permanecerão nas mesmas proporções relativas, $p^2{:}2pq{:}q^2$. A prova deste equilíbrio é mostrada no Quadro 7.4. É importante notar que o equilíbrio de Hardy-Weinberg não especifica nenhum valor particular para p e q: *quaisquer que sejam as freqüências alélicas presentes na população resultarão nas freqüências genotípicas de* $p^2{:}2pq{:}q^2$ *e estas freqüências genotípicas relativas continuarão constantes de geração para geração enquanto as freqüências alélicas permanecerem constantes.*

Aplicando a fórmula de Hardy-Weinberg ao exemplo de *CCR5* dado anteriormente, com as freqüências relativas dos dois alelos no *pool* de genes de 0,906 (para o alelo normal *CCR5*) e 0,094 (para *ΔCCR5*), a lei de Hardy-Weinberg diz que as proporções relativas das três combinações de alelos (genótipos) são $p^2 = 0{,}906 \times 0{,}906 = 0{,}821$ (para obter dois alelos *CCR5* do *pool*), $q^2 = 0{,}094 \times 0{,}094 = 0{,}009$ (para dois alelos *ΔCCR5*) e $2pq = (0{,}906 \times 0{,}094) + (0{,}094 \times 0{,}906) = 0{,}170$ (para um

QUADRO 7-4

Freqüências de Tipos Reprodutivos e Proles para uma População em Equilíbrio de Hardy-Weinberg com Genótipos Parentais na Proporção $p^2{:}2pq{:}q^2$

Tipos Reprodutivos			Prole		
Mãe	*Pai*	*Freqüência*	*AA*	*Aa*	*aa*
AA	*AA*	$p^2 \times p^2 = p^4$	$1\ (p^4)$		
AA	*Aa*	$p^2 \times 2pq = 2p^3q$	$1/2\ (2p^3q)$	$1/2\ (2p^3q)$	
Aa	*AA*	$2pq \times p^2 = 2p^3q$	$1/2\ (2p^3q)$	$1/2\ (2p^3q)$	
AA	*aa*	$p^2 \times q^2 = p^2q^2$		$1\ (p^2q^2)$	
aa	*AA*	$p^2 \times q^2 = p^2q^2$		$1\ (p^2q^2)$	
Aa	*Aa*	$2pq \times 2pq = 4p^2q^2$	$1/4\ (4p^2q^2)$	$1/2\ (4p^2q^2)$	$1/4\ (4p^2q^2)$
Aa	*aa*	$2pq \times q^2 = 2pq^3$		$1/2\ (2pq^3)$	$1/2\ (2pq^3)$
aa	*Aa*	$2pq \times q^2 = 2pq^3$		$1/2\ (2pq^3)$	$1/2\ (2pq^3)$
aa	*aa*	$q^2 \times q^2 = q^4$			$1\ (q^4)$
Genótipos resultantes de todas as reproduções possíveis			p^2	$2pq$	q^2

Soma da prole $AA = p^4 + 2q^3q + p^2q^2 = p^2(p^2 + 2pq + q^2) = p^2(p + q)^2 = p^2$ (Lembre que $p + q = 1$)
Soma da prole $Aa = 2p^3q + 4p^2q^2 + 2pq^3 = 2pq(p^2 + 2pq + q^2) = 2pq(p + q)^2 = 2pq$
Soma da prole $aa = p^2q^2 + 2pq^3 + q^4 = q^2(p^2 + 2pq + q^2) = q^2(p + q)^2 = q^2$

CCR5 e um alelo *ΔCCR5*). Quando estas freqüências genotípicas, que foram *calculadas* usando a lei de Hardy-Weinberg, são aplicadas a uma população de 788 indivíduos, os números obtidos de pessoas com os três genótipos diferentes (647:134:7) são, de fato, idênticos aos reais, *observados* no Quadro 7.3.

Como vimos, as distribuições de Hardy-Weinberg dos genótipos nas populações são simplesmente uma distribuição binomial $(p + q)^n$, na qual os símbolos p e q representam as freqüências de dois alelos alternativos em um locus (em que $p + q = 1$) e $n = 2$, representando o par de alelos em qualquer locus autossômico ou qualquer locus ligado ao X nas mulheres. (Como os homens são únicos em ter só um cromossomo X, as freqüências de genes ligados ao X nos homens serão consideradas separadamente, mais adiante.) Se um locus tiver três alelos, com as freqüências p, q e r, a distribuição genotípica poderá ser determinada por $(p + q + r)^2$. Em termos gerais, as freqüências genotípicas para qualquer número conhecido de alelos a_n com freqüências alélicas $p_1, p_2 \ldots p_n$ podem ser obtidas a partir dos termos da expansão de $(p_1 + p_2 + \ldots p_n)^2$.

Uso da Lei de Hardy-Weinberg

A principal aplicação prática da lei de Hardy-Weinberg em genética médica é na consulta genética para distúrbios autossômicos recessivos. Para uma doença tal como a **fenilcetonúria** (PKU) (ver Cap. 12), a freqüência de homozigotos afetados na população pode ser determinada com precisão, pois a doença é identificada pelos programas de triagem neonatal. Os heterozigotos, entretanto, são assintomáticos, portadores silenciosos, e sua incidência populacional é impossível de avaliar diretamente pelo fenótipo. A lei de Hardy-Weinberg permite que uma estimativa da freqüência de heterozigotos seja feita e usada subseqüentemente para a consulta. Por exemplo, a freqüência de PKU é de cerca de 1/4.500 na Irlanda. Como todos os indivíduos afetados são homozigotos para um alelo mutante, $q^2 = 1/4.500$ e, portanto, $q = \sqrt{1/4.500} = 0{,}015$ e $2pq = 0{,}029$ ou cerca de 3%. A freqüência de portadores na população irlandesa é, portanto, de 3%, e haveria uma chance de aproximadamente 3% de um genitor conhecido como portador de PKU pelo nascimento de um filho afetado descobrir que um novo cônjuge de etnicidade irlandesa também é portador. Se este novo cônjuge fosse da Finlândia, entretanto, onde a freqüência de PKU é muito menor (± 1/200.000), sua chance de ser portador(a) seria de apenas 0,6%.

FREQÜÊNCIAS DE GENES E GENÓTIPOS LIGADOS AO X

Lembre-se de que para genes ligados ao X só existem dois genótipos masculinos possíveis, mas três genótipos femininos. Para ilustrar as freqüências gênicas e freqüências genotípicas quando o gene de interesse é ligado ao X, usamos a característica conhecida como daltonismo vermelho-verde, que é causada por mutações nas séries de genes de pigmento visual vermelho e verde no cromossomo X. Usamos o daltonismo como um exemplo porque, tanto quanto sabemos, esta não é uma característica deletéria (exceto por possíveis dificuldades nos sinais de trânsito), e as pessoas daltônicas não são sujeitas à seleção. Como já foi discutido, considerar o efeito da seleção complica as estimativas de freqüências gênicas.

Usamos o símbolo *cb* para o alelo mutante de daltonismo e o símbolo + para o alelo normal, com as freqüências q e p, respectivamente, como mostra o Quadro 7.5. As freqüências dos alelos normal e mutante podem ser determinadas diretamente pela incidência dos fenótipos correspondentes nos *homens* simplesmente contando os alelos. Como as mulheres têm dois cromossomos X, seus genótipos são distribuídos binomialmente, da mesma forma que os genótipos autossômicos, mas como os alelos de daltonismo são recessivos os homozigotos normais e heterozigotos não são distinguíveis. Como mostra o Quadro 7.5, a freqüência de daltonismo nas mulheres é muito mais baixa que nos homens, muito embora as freqüências alélicas sejam, logicamente, as mesmas em ambos os sexos. Menos de 1% das mulheres são daltônicas, mas quase 15% são portadoras de um alelo mutante para daltonismo e estão, portanto, em risco de ter filhos daltônicos.

FATORES QUE PERTURBAM O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

A formulação da lei de Hardy-Weinberg requer várias suposições fundamentais citadas no Quadro 7.6. No mundo real da genética médica envolvendo populações humanas e alelos de doenças, estas suposições em geral não se confirmam, e os genótipos em uma população podem não estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como será mostrado nas seções que se seguem, a violação da suposição de reprodução aleatória pode causar grandes desvios da freqüência da doença baseada em freqüências alélicas. Por outro lado, as mudanças em freqüências alélicas decorrentes de mutação, seleção ou migração causam mais desvios pequenos e sutis do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se o equilíbrio de Hardy-Weinberg não ocorrer em um determinado locus, é instrutivo investigar *por que* um determinado alelo de doença e seus genótipos associados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma determinada população. Quais das suposições subjacentes estão sendo violadas e o que isto nos ensina sobre a população que está sendo estudada, a taxa de mutação para este locus, e o efeito do alelo da doença na sobrevivência e na reprodução?

QUADRO 7–5

Genes Ligados ao X e Freqüências Genotípicas (Daltonismo)

Sexo	Genótipo	Fenótipo	Incidência (Aproximada)
Homem	X^+	Visão em cores normal	$p = 0{,}92$
	X^{cb}	Daltonismo	$q = 0{,}08$
Mulher	X^+/X^+	Normal (homozigoto)	$p^2 = (0{,}92)^2 = 0{,}8464$
	X^+/X^{cb}	Normal (heterozigoto)	$2pq = 2(0{,}92)(0{,}08) = 0{,}1472$
		Normal (total)	$p^2 + 2pq = 0{,}9936$
	X^{cb}/X^{cb}	Daltônico	$q^2 = (0{,}08)^2 = 0{,}0064$

QUADRO 7–6

A Lei de Hardy-Weinberg É Baseada em Várias Suposições

1. A população é grande e as reproduções são aleatórias com relação ao locus em questão
2. As freqüências alélicas permanecem constantes com o tempo porque:
   (a) Não há uma taxa apreciável de mutação
   (b) Os indivíduos com todos os genótipos são igualmente capazes de se reproduzir e transmitir seus genes, ou seja, não há seleção contra nenhum genótipo em particular
   (c) Não houve imigração significativa de indivíduos de uma população com freqüências alélicas muito diferentes da população endógena

Exceções à Reprodução Aleatória

O princípio da reprodução aleatória é que, para qualquer locus, um indivíduo com um determinado genótipo tem uma probabilidade puramente aleatória de se casar com outro de qualquer outro genótipo, sendo as proporções determinadas apenas pelas freqüências relativas dos diferentes genótipos na população. A simples observação, entretanto, mostra que vários fatores, alguns geneticamente significativos e outros provavelmente neutros em termos genéticos, entram na escolha de um cônjuge. Estes fatores são a **estratificação**, o **casamento preferencial** e a **consangüinidade.**

ESTRATIFICAÇÃO

Uma população estratificada é aquela que contém vários subgrupos que permaneceram, em sua maior parte, geneticamente distintos durante a evolução moderna. Em todo o mundo, existem várias populações estratificadas. Por exemplo, a população dos EUA é estratificada em dois subgrupos principais, os caucasianos e os afro-americanos, bem como vários outros subgrupos, incluindo os americanos nativos, os asiáticos e os hispânicos. De modo semelhante, as freqüências gênicas podem variar muito entre os países da Europa ou da Ásia. Quando a seleção de cônjuges em uma população é restrita a membros de um determinado subgrupo dentro desta população, o resultado para qualquer locus com mais de um alelo é um excesso de homozigotos na população como um todo e uma correspondente deficiência de heterozigotos.

Suponha que uma população contém um grupo minoritário constituído de 10% da população na qual um alelo mutante para uma doença autossômica recessiva tem uma freqüência $q_{min} = 0,05$. Na maioria restante de 90% da população, q_{maj} é de quase 0. Um exemplo de tal situação é a população afro-americana dos EUA e o alelo mutante do locus de β-globina responsável pela anemia falciforme. A freqüência geral do alelo da doença na população total, q_{pop}, é, portanto, igual a 0,05/10 = 0,005 e, simplesmente se aplicando a lei de Hardy-Weinberg, a freqüência da doença na população como um todo seria de $q^2_{pop} = 0,000025$, se a reprodução fosse perfeitamente aleatória em toda a população. Em muitos casos, entretanto, um grupo minoritário se reproduz quase que exclusivamente com outros membros do grupo minoritário. Então, a freqüência de indivíduos afetados no grupo minoritário seria (q^2_{min}) = 0,0025, e como o grupo minoritário representa 1/10 da população total, a verdadeira freqüência da doença na população total é de 0,0025/10 = 0,00025, 10 vezes maior do que se esperaria aplicando a lei de Hardy-Weinberg à população como um todo sem considerar a estratificação. Por comparação, a estratificação não tem efeito na freqüência de uma doença autossômica dominante e só teria um efeito muito pequeno na freqüência de uma doença ligada ao X aumentando o pequeno número de mulheres homozigotas para o alelo mutante.

Como os subgrupos provavelmente têm freqüências diferentes de vários genes de doenças autossômicas recessivas, suas doenças características provavelmente diferem. Os exemplos bem conhecidos incluem a doença de Tay-Sachs nas pessoas com ancestrais judeus Ashkenazi, tipos característicos de talassemia nas pessoas do Mediterrâneo ou descendentes do leste da Ásia, anemia falciforme em afro-americanos e fibrose cística e PKU em caucasianos (ver os quadros 7.1 e 7.7). Cada

QUADRO 7–7

Incidência, Freqüência Gênica e Freqüência de Heterozigotos para Distúrbios Autossômicos Recessivos Selecionados em Populações Diferentes

Distúrbio	População	Incidência (q^2)	Freqüência Gênica (q)	Freqüência de Heterozigotos ($2pq$)	Heterozigotos / Homozigotos ($2pq/q^2$)
Anemia falciforme (genótipo *S/S*)	Afro-americanos	1 em 400	0,05	1 em 11	38
	Hispano-americanos	1 em 40.000	0,005	1 em 101	396
Deficiência de α_1-antitripsina (genótipo *Z/Z*)	Dinamarca	1 em 2.000	0,023	1 em 22	90
	Afro-americanos dos EUA	1 em 100.000	0,004	1 em 125	800
Fibrose cística	Caucasianos dos EUA	1 em 2.000	0,023	1 em 22	90
Fenilcetonúria	Escócia	1 em 5.300	0,014	1 em 30	175
	Finlândia	1 em 200.000	0,002	1 em 250	800
	Japão	1 em 109.000	0,003	1 em 166	657
Doença de Tay-Sachs	Judeus Ashkenazi dos EUA	1 em 3.900	0,016	1 em 30	130
	Caucasianos não-Ashkenazi dos EUA	1 em 112.000	0,003	1 em 170	660

Os números são aproximados. Dados do Online Mendelian Inheritance in Man (<*http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/*>) e de Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) (2000) The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8.ª ed. McGraw-Hill, New York

subgrupo parece ter seu próprio perfil de distúrbios que são mais comuns e outros que são menos comuns que na espécie como um todo.

A Estratificação Afeta a Freqüência de Alelos Específicos de Doenças

Muitos distúrbios genéticos são caracterizados por mutações alélicas que variam em freqüência entre populações de diferentes grupos, provavelmente porque um pequeno número de mutações ancestrais tornou-se prevalecente em determinadas populações e não se espalhou para a população como um todo devido à estratificação. A existência de alelos mutantes específicos de populações tem um significado para a compreensão das origens das doenças genéticas e também cria oportunidades para o diagnóstico de alelos específicos em uma população de risco. Por exemplo, os estudos da β-talassemia levaram à identificação de defeitos moleculares específicos no gene de β-globina e ao reconhecimento de suas distribuições populacionais (ver Cap. 11). Muito embora dúzias de alelos diferentes possam causar β-talassemia, alguns alelos tendem a ser mais comuns em algumas populações que em outras, de modo que cada população tem apenas alguns alelos comuns (Quadro 7.8). Por exemplo, os alelos mais comuns de β-talassemia em pessoas do Mediterrâneo, responsáveis por mais de 90% dos casos da doença, são muito raros nas pessoas do sudeste da Ásia ou da Ásia subcontinental. De modo similar, os alelos mais comuns nos indivíduos do sudeste da Ásia e nos índios asiáticos são raros nos dois outros grupos étnicos não-relacionados. Esta informação é de grande valor prático na consulta genética e no diagnóstico pré-natal. Por exemplo, na América do Norte, quando as pessoas descendentes do Mediterrâneo estão em risco de ter um filho com β-talassemia, o teste do DNA parental para apenas sete alelos mutantes tem mais de 90% de probabilidade de dar a informação necessária ao diagnóstico pré-natal. Uma freqüência similar aumentada de alguns alelos mutantes foi observada em populações específicas para muitas outras doenças genéticas (Quadro 7.9).

Casamento Preferencial

O casamento preferencial é a escolha de um parceiro porque ele possui alguma característica determinada. O casamento preferencial em geral é positivo, isto é, a pessoa tende a escolher uma outra que lhe seja similar (p. ex., mesma língua, inteligência, estatura, cor da pele, talento musical ou habilidade atlética). O casamento preferencial negativo, a seleção de um parceiro com características diferentes de si mesmo, é menos comum. Do ponto de vista de que a característica compartilhada pelos parceiros é geneticamente determinada, o efeito genético geral do casamento preferencial positivo é um aumento na proporção de genótipos homozigotos à custa do genótipo heterozigoto.

QUADRO 7–8

Alelos de β-talassemia em Diferentes Grupos Étnicos

População	N.º de Alelos de β-talassemia
Mediterrânea	15 (7 correspondem a 92% do total)
Chinesa/Sudeste da Ásia	9 (8 correspondem a 91% do total)
Asiáticos Indianos	10 (5 correspondem a 90% do total)

QUADRO 7–9

Etnicidade de Doenças Genéticas

α^0-talassemia	Diferentes mutações de deleção no Mediterrâneo e sudeste da Ásia.
Atrofia de giro	Única mutação predominante no gene de ornitina aminotransferase na Finlândia. Mutações diferentes encontradas em outras populações.
Doença de Tay-Sachs	Inserção de 4 pares de bases no éxon 11 e uma substituição de G por C no primeiro nucleotídeo do íntron 12 são as duas mutações comuns nos judeus Ashkenazi; uma deleção de 7,6 kb na ponta 5′ do gene é a mutação mais comum nos franco-canadenses. Outros alelos são vistos em outras populações.
Câncer de mama hereditário (*BRCA1* e *BRCA2*)	Heterogeneidade mutacional na maioria das populações, mas deleção de 2 pares de bases na posição 185 e 1 inserção de par de bases na posição 5.382 em *BRCA2* e deleção de um par de bases em 6.174 em *BRCA1* constituem a maioria dos alelos mutantes nos judeus Ashkenazi.
Hipercolesterolemia familiar	Heterogeneidade mutacional na maioria das populações, mas os franco-canadenses têm uma mutação predominante, uma deleção do promotor e do éxon 1; um códon de término prematuro no aminoácido 660 é muito freqüente nos libaneses, mas raro em outras partes.

Um aspecto clinicamente importante do casamento preferencial é a tendência de escolher parceiros com problemas médicos similares, tais como surdez ou cegueira congênita ou estatura excepcionalmente baixa (nanismo). Em tais casos, a expectativa do equilíbrio de Hardy-Weinberg não se aplica, pois o genótipo do parceiro no locus da doença não é determinado pelas freqüências alélicas encontradas na população em geral. Por exemplo, no caso de dois genitores com acondroplasia, um distúrbio dominante, a prole homozigota para o gene de acondroplasia tem uma forma grave e letal de nanismo que quase nunca é vista, a menos que ambos os genitores sejam heterozigotos para acondroplasia.

Quando os parceiros têm distúrbios autossômicos recessivos causados pela mesma mutação ou por mutações alélicas no mesmo gene, toda a sua prole também terá a doença. Logicamente, nem toda surdez, cegueira ou baixa estatura tem a mesma base genética. Por exemplo, foram descritas muitas famílias nas quais dois genitores albinos tiveram filhos com pigmentação normal ou dois genitores surdos tiveram filhos com audição normal devido à heterogeneidade de locus (discutida no Cap. 5). No entanto, mesmo se houver uma heterogeneidade genética, com o casamento preferencial a chance de que as duas pessoas estejam portando mutações no mesmo locus de doença aumenta em relação ao que aumentaria com uma reprodução aleatória e, portanto, o risco do distúrbio em sua prole também aumenta. Embora para a população o efeito a longo prazo deste tipo de casamento preferencial positivo sobre as freqüências de genes de doença seja insignificante, uma família específica pode se encontrar em um risco genético muito alto.

CONSANGÜINIDADE

O **casamento consangüíneo** ou **endogamia**, assim como a estratificação e o casamento preferencial positivo, causa um aumento na freqüência de doenças autossômicas recessivas pelo aumento da freqüência com a qual os portadores de um distúrbio autossômico recessivo se casam. Ao contrário dos distúrbios em populações estratificadas, nos quais cada subgrupo provavelmente tem uma alta freqüência de alguns alelos, os tipos de distúrbios recessivos vistos na prole de genitores aparentados podem ser muito raros e incomuns, pois os casamentos consangüíneos permitem que alelos incomuns fiquem em homozigose.

Exceções à Constância das Freqüências Alélicas

Em contraste com o casamento não-aleatório, que pode perturbar muito o equilíbrio de Hardy-Weinberg, as mudanças nas freqüências alélicas decorrentes de seleção, mutação ou migração em geral ocorrem lentamente, em pequenos aumentos, e causam muito menos desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A mutação e a migração em geral ocorrem em taxas que estão bem abaixo da freqüência de portadores e, assim, também têm pouco efeito a curto prazo sobre a freqüência alélica geral. Como veremos mais adiante, a seleção também tem pouco efeito nas freqüências alélicas em doenças autossômicas recessivas, pois a grande maioria dos alelos mutantes está protegida da seleção negativa nos heterozigotos. Entretanto, para doenças dominantes ou ligadas ao X, bem como no caso dos heterozigotos para doenças recessivas que têm vantagem seletiva sobre os homozigotos para o alelo normal, a seleção pode perturbar significativamente as freqüências alélicas em relação ao que seria esperado sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg, reduzindo ou aumentando substancialmente alguns genótipos.

MUTAÇÃO E SELEÇÃO

A base molecular da mutação foi considerada em detalhes no Cap. 6. No presente contexto, introduzimos o conceito de **adaptabilidade**, o principal fator que determina se uma mutação é imediatamente perdida, torna-se estável na população ou até mesmo, com o tempo, transforma-se no alelo predominante no locus envolvido. A freqüência de um alelo em uma população representa um balanço entre a taxa na qual os alelos mutantes surgem por mutação e os efeitos da seleção. Se a taxa de mutação ou a efetividade da seleção for alterada, a freqüência do alelo deverá mudar.

A transmissão de um alelo para a geração seguinte depende de sua adaptabilidade (f), que é uma medida do número de descendentes de pessoas afetadas que sobrevivem até a idade reprodutiva, quando comparados com um grupo controle apropriado. Se um alelo mutante tiver a mesma probabilidade que o alelo normal de ser representado na geração seguinte, f será igual a 1. Se um alelo causar a morte ou esterilidade, o que significa que a seleção atua totalmente contra ele, f será igual a 0. Um parâmetro relacionado é o **coeficiente de seleção,** s, que é a medida da perda de adaptabilidade e é definido por $1 - f$. Do ponto de vista genético, uma mutação que impede a reprodução por um alelo é tão letal quanto uma que causa um aborto de um embrião, pois em ambos os casos o mutante não é transmitido para a geração seguinte. A adaptabilidade é, portanto, o resultado dos efeitos conjuntos da sobrevida e da fertilidade. No sentido biológico, a adaptabilidade não tem conotação de capacidade superior, exceto em um aspecto: a habilidade comparativa para contribuir para o *pool* de genes da geração seguinte.

SELEÇÃO CONTRA MUTAÇÕES AUTOSSÔMICAS DOMINANTES

Os alelos mutantes dominantes estão totalmente expostos à seleção, em contraste com os alelos mutantes recessivos, cuja maioria está "escondida" nos heterozigotos. Conseqüentemente, os efeitos da seleção e da mutação são mais óbvios e podem ser mais prontamente avaliados para características dominantes. Um alelo dominante letal, se totalmente penetrante, é exposto à seleção nos heterozigotos, havendo a remoção de todos os alelos responsáveis pelo distúrbio em uma única geração. Várias doenças humanas são suspeitas ou conhecidas como sendo características autossômicas dominantes com adaptabilidade zero ou quase zero e, portanto, sempre resultam de mutações novas, em vez de herdadas, autossômicas dominantes (Quadro 7.10). Em algumas delas, os genes e os alelos mutantes específicos são conhecidos, e os estudos familiares mostram mutações novas nos indivíduos afetados que não foram herdadas dos genitores. Em outras condições, os genes não são conhecidos, mas o efeito da idade paterna (ver Cap. 6) já foi visto, o que sugere (mas não prova) uma nova mutação na linhagem germinativa paterna como uma possível causa do distúrbio. A implicação para a consulta genética é que o genitor de uma criança com uma condição genética letal autossômica dominante tem um risco baixo de recorrência, pois a condição em geral necessitaria de outra mutação independente para recorrer (exceto nas raras circunstâncias de mosaicismo da linhagem germinativa para a condição; ver Cap. 5).

Se uma doença dominante for deletéria mas não letal, as pessoas afetadas poderão se reproduzir, mas, entretanto, contribuirão com menos que o número médio de prole para a geração seguinte. Isto é, sua adaptabilidade, f, pode ser reduzida. Tal mutação é perdida por seleção a uma taxa proporcional à perda

QUADRO 7–10

Exemplos de Distúrbios que Ocorrem como Condições Esporádicas Devidas a Genes Autossômicos Dominantes com Adaptabilidade Zero

Acrodisostose	Anomalias congênitas múltiplas, especialmente mãos curtas com disostose periférica, nariz pequeno e deficiência mental.
Síndrome de Apert	Craniosinostose, polegar e hálux grandes, órbitas rasas, hipertelorismo e deficiência mental variável, mas freqüente. Mutação no gene receptor-2 do fator de crescimento de fibroblasto. É muito raro que uma pessoa com esta síndrome dismórfica tenha prole. Caso tenha, cerca de 50% da prole é afetada.
Atelosteogênese	Forma letal precoce de nanismo de membros curtos.
Síndrome de Cornelia de Lange	Retardo mental, micromelia, sinofris e outras anomalias.
Síndrome de hiperostose de Lenz-Majewski	Osso denso; sinfalangismo; pele frouxa.
Osteogênese imperfeita, tipo 2	Tipo letal perinatal, com um defeito no colágeno tipo 1 (ver Cap. 12).
Displasia tanatofórica	Forma letal precoce de nanismo de membros curtos devida a mutações no gene de receptor-3 do fator de crescimento de fibroblasto.

de adaptabilidade dos heterozigotos. Por exemplo, os anões acondroplásicos têm apenas cerca de um quinto dos filhos que as pessoas normais da população. Assim, sua adaptabilidade média, f, é 0,20, e o coeficiente de seleção, s, é 0,80. Na geração subseqüente, apenas 20% dos atuais alelos de acondroplasia são passados adiante pela atual geração para a seguinte. Como a freqüência da acondroplasia não está diminuindo, novas mutações devem ser responsáveis por substituir os 80% de genes mutantes na população perdidos pela seleção.

O Balanço Entre Mutação e Seleção nas Doenças Dominantes

A taxa de mutação dos distúrbios autossômicos dominantes pode ser medida tanto direta quanto indiretamente. Como vimos no Cap. 6, as medidas diretas são precisas apenas quando todos os casos de um distúrbio na população são corretamente diagnosticados e avaliados e os pacientes com genitores não-afetados são identificados. Também podemos medir a incidência de uma nova mutação em um locus de doença indiretamente se houver disponibilidade de uma medida precisa da adaptabilidade: a taxa de mutação por geração em um locus de doença deve ser suficiente para justificar a proporção de alelos mutantes perdidos pela seleção em cada geração. Assim, a taxa de mutação, μ, deve ser igual ao coeficiente de seleção, s, vezes a freqüência do alelo, q.

A freqüência alélica observada em qualquer geração representa um balanço entre a perda de alelos mutantes pelos efeitos da seleção e o ganho de alelos mutantes por mutação recorrente. Uma freqüência estável de alelo é atingida em qualquer nível que balanceie as duas forças opostas: uma (seleção) que remove alelos mutantes do *pool* de genes e uma (mutação nova) que volta a adicionar uma nova. Assim, se a adaptabilidade das pessoas afetadas repentinamente aumentasse (em função dos avanços médicos, por exemplo), a incidência observada da doença na população aumentaria e atingiria um novo equilíbrio. O retinoblastoma e alguns outros tumores embrionários dominantes com início na infância são exemplos de condições que agora têm um prognóstico muito melhor, com as previstas conseqüências do aumento de freqüência gênica na população. Por outro lado, se as pessoas afetadas decidirem não ter nenhum filho (reduzindo assim efetivamente a adaptabilidade do alelo mutante a zero), a incidência da doença imediatamente cairia, não a zero, mas a um nível mantido pela introdução de novas mutações no *pool* gênico em cada geração. A freqüência alélica, a taxa de mutação e a adaptabilidade estão relacionadas. Assim, se quaisquer duas destas três características forem conhecidas, poderemos avaliar a terceira.

Seleção Contra Mutações Autossômicas Recessivas

A seleção contra mutações recessivas prejudiciais tem muito menos efeito na freqüência populacional do alelo mutante que a seleção contra mutações dominantes porque, como já foi discutido, apenas uma pequena proporção dos genes está presente nos homozigotos e, portanto, exposta às forças seletivas. Mesmo que ocorresse uma seleção completa contra os homozigotos ($f = 0$), como em muitas condições letais autossômicas recessivas, levaria muitas gerações para reduzir significativamente a freqüência gênica, pois a maioria dos alelos mutantes é levada por heterozigotos com adaptabilidade normal. Por exemplo, a freqüência de alelos mutantes causadores de PKU, q, é de aproximadamente 1% em muitas populações caucasianas. Dois por cento da população ($2 \times p \times q$) é heterozigota, com um alelo mutante, enquanto apenas 1 indivíduo em 10.000 (q^2) é um homozigoto com dois alelos mutantes. A proporção de alelos mutantes nos heterozigotos é dada por

$$\frac{2/10.000}{(2/10\,000) + (1/100)} = \pm\ 0{,}02$$

Assim, apenas cerca de 2% de todos os alelos mutantes na população estão em homozigotos afetados e, portanto, expostos à seleção se um tratamento dietético não estiver disponível. Eliminar a seleção contra um distúrbio autossômico recessivo tal como a PKU por meio de tratamentos médicos bem-sucedidos teria um efeito muito lento no aumento da freqüência gênica em muitas gerações. *Assim, desde que os casamentos sejam aleatórios, os genótipos em doenças autossômicas recessivas podem ser considerados como estando em equilíbrio de Hardy-Weinberg, a despeito da seleção contra os homozigotos para o alelo recessivo. A relação matemática entre genótipo e freqüências alélicas descrita na lei de Hardy-Weinberg se mantém para a maioria dos fins práticos em genética médica.* Exemplos selecionados das relações entre a incidência, a freqüência gênica e a freqüência de portadores (heterozigotos) para doenças autossômicas recessivas em vários grupos étnicos são mostrados no Quadro 7.7.

Seleção Contra Mutações Recessivas Ligadas ao X

Quase todos os fenótipos ligados ao X de interesse médico são recessivos, e, portanto, como regra geral, a seleção ocorre em homens hemizigotos e não em mulheres heterozigotas, exceto para a pequena proporção de mulheres que são heterozigotas manifestantes com baixa adaptabilidade. Nesta rápida discussão, entretanto, assumimos que as mulheres heterozigotas têm adaptabilidade normal.

Se um fenótipo ligado ao X for benigno e se os homens afetados tiverem adaptabilidade normal, um terço dos alelos mutantes correspondentes estará nos homens e dois terços estarão nas mulheres, como já foi mostrado na discussão do daltonismo. Nos graves distúrbios clínicos ligados ao X, tal como a distrofia muscular Duchenne (DMD), nos quais os homens afetados não se reproduzem, apenas os genes presentes nas mulheres portadoras são transmitidos para a geração seguinte (ver Quadro 7.11). Assim, nas doenças como a DMD, na qual há uma desvantagem seletiva operando apenas contra os homens hemizigotos (e, portanto, apenas contra um terço dos alelos mutantes), a taxa de mutação deve ser igual ao coeficiente de seleção, s, vezes $q/3$. Quando $s = 1$, tais doenças são chamadas **letais genéticos** ligados ao X, e um terço de todas as cópias de tal gene mutante perde-se em cada geração. Como vimos no caso das mutações autossômicas dominantes, os alelos mutantes perdidos por seleção devem ser substituídos por novas mutações recorrentes para manter a incidência da doença observada. Portanto, prevê-se que um terço de todas as pessoas que têm tais distúrbios letais ligados ao X tem uma mutação nova, e suas mães geneticamente normais têm pouco risco de ter filhos subseqüentes com o mesmo distúrbio (sem mosaicismo).

Nos distúrbios menos graves, tais como a hemofilia A, a proporção de indivíduos afetados que representam mutações novas é menor que um terço (de fato, cerca de 15%). Como o tratamento da hemofilia está melhorando rapidamente, a freqüência total de alelos mutantes deverá crescer relativamente rápido e atingir um novo equilíbrio, como vimos no caso das condições autossômicas dominantes. Supondo que a taxa de mutação neste locus permaneça a mesma, a *proporção* de hemofílicos que resulta de uma

QUADRO 7-11

Incidência e Prevalência de Heterozigotos para Distúrbios Ligados ao X Selecionados

Distúrbio	População	Incidência em Homens Afetados (Nativivos Masculinos)	Prevalência em Heterozigotas (População Feminina)	Comentários
Distrofia muscular Duchenne	Europa, EUA, Japão	1/3.650	1/2.740	Prevalência de heterozigotas calculada supondo-se adaptabilidade $f = 0$ e taxas de mutação iguais em homens e mulheres
Hemofilia A	EUA	1/5.000	1/2.500	Prevalência em heterozigotas calculada supondo-se adaptabilidade $f = 0{,}7$ e taxa de mutação masculina >> taxa de mutação feminina (15:1)
Deficiência de ornitina transcarbamilase	Japão	1/80.000	1/62.500	Prevalência em heterozigotas calculada supondo-se adaptabilidade $f = 0$ e taxas de mutação iguais em homens e mulheres
Síndrome do X frágil	Austrália, EUA, Finlândia, Taiwan, Holanda	1-2/6.000	1/3.200 (com ± metade afetada)	Prevalência de heterozigotas (portadoras de mutação total) estimada
			1-2/500 portadoras de pré-mutação	Prevalência de heterozigotas (portadoras de pré-mutação) medida

Os números são aproximados. Os dados são do On-line Mendelian Inheritance in Man (<*http //www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/*); Scriver C. R. *et al* (1997) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, CD-ROM; de Vries B. B. *et al* (1997) Screening and diagnosis for the fragile X syndrome among the mentally retarded: An epidemiological and psychological survey. Am J Hum Genet 61:660-667; Morton J. E. *et al* (1997) Fragile X syndrome is less common than previously estimated. J Med Genet 34:1-5; Reiss A. L. *et al* (1994) Frequency and stability of the fragile X premutation. Hum Mol Genet 3:393-398; Rousseau F. (1995) Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene — and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. Am J Hum Genet 57:1006-1018; Ryynanen M. *et al* (1999) Feasibility and acceptance of screening for fragile X mutations in low-risk pregnancies. Eur J Hum Genet 7:212-216; Turner G. *et al* (1996) Prevalence of fragile X syndrome. Am J Med Genet 64:196-197; Tzeng C. C. *et al* (1999) Pilot fragile X screening in normal population of Taiwan. Diagn Mol Pathol 8:152-156.

nova mutação diminuirá, muito embora a incidência da doença aumente. Tal mudança teria implicações significativas para a consulta genética deste distúrbio (ver Cap. 19).

Seleção a Favor de Heterozigotos (Vantagem do Heterozigoto)

As considerações feitas nas seções anteriores explicam as freqüências atuais de alelos mutantes raros como um balanço entre a perda por seleção e o ganho por mutações novas. Entretanto, como podemos explicar os distúrbios nos quais o alelo mutante atinge freqüências bem altas, a despeito da adaptabilidade reduzida dos indivíduos afetados portadores destes alelos? Por exemplo, as freqüências de portadores na fibrose cística são de 5% entre os caucasianos, enquanto a freqüência da mutação da anemia falciforme nos afro-americanos é de 9% a 10%. Considerando a seleção substancial contra homozigotos para estes alelos mutantes, as duas únicas explicações possíveis são as seguintes: (1) O alelo mutante está em uma freqüência maior que a esperada em função de um fenômeno conhecido como **deriva genética**: a população, embora razoavelmente grande agora, na verdade é derivada de um grupo muito pequeno de indivíduos, nos quais, apenas pelo acaso, a freqüência do alelo da doença começou muito alta. A freqüência do alelo mutante na verdade não está estavelmente elevada, mas ainda não passou tempo suficiente para que a seleção nos homozigotos diminua a freqüência do alelo da doença. O papel da deriva genética será tratado na próxima seção. (2) A freqüência do alelo mutante é estavelmente elevada para um nível maior que o esperado, que é mantido seja pela taxa de mutação extraordinariamente alta ou pelo aumento da adaptabilidade dos portadores heterozigotos sobre os homozigotos normais em determinados ambientes.

Uma taxa de mutação elevada poderia, teoricamente, manter a alta freqüência de um alelo deletério que é perdido de modo eficiente por seleção nas pessoas homozigotas recessivas. Entretanto, não existe evidência de taxas de mutação aumentadas em distúrbios tais como a anemia falciforme ou a fibrose cística. O que existe, em vez disso, são situações ambientais nas quais os heterozigotos para algumas doenças têm uma adaptabilidade aumentada em relação a ambos os genótipos homozigotos, uma situação chamada de **vantagem do heterozigoto**. Mesmo uma pequena vantagem do heterozigoto pode levar a um aumento na freqüência de um alelo que é gravemente prejudicial nos homozigotos, pois os heterozigotos superam em número os homozigotos na população.

Um exemplo bem conhecido de vantagem dos heterozigotos, embora não a única, é a resistência à malária nos heterozigotos para a mutação da anemia falciforme. O alelo falcêmico atingiu sua freqüência mais alta em certas regiões do oeste da África, onde os heterozigotos são mais bem adaptados que ambos os homozigotos porque têm resistência ao organismo da malária. Nas regiões onde a malária é endêmica, os homozigotos normais são suscetíveis à malária. Muitos são infectados e afetados de forma grave, ou mesmo fatal, levando a uma adaptabilidade muito reduzida. Os homozigotos para a anemia falciforme são ainda mais gravemente prejudicados, com uma adaptabilidade perto de

zero, por causa de sua grave doença hematológica (ver Cap. 11). Os heterozigotos para a anemia falciforme têm hemácias inóspitas ao organismo da malária, mas não sofrem afoiçamento sob condições ambientais normais. Os heterozigotos são relativamente mais adaptados que ambos os homozigotos e se reproduzem em alta taxa. Assim, com o tempo, o alelo mutante da anemia falciforme atingiu uma freqüência tão alta quanto 0,15 em algumas áreas do oeste da África onde há malária endêmica, uma freqüência bem mais alta do que se poderia esperar por mutação recorrente.

A vantagem do heterozigoto na anemia falciforme demonstra como a violação de uma das suposições fundamentais do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a de que as freqüências alélicas não são significativamente alteradas pela seleção, faz com que a relação matemática entre as freqüências alélicas e genotípicas sejam diferentes daquelas esperadas pela lei de Hardy-Weinberg. Considere dois alelos, o normal *A* e o mutante *S*, que dão origem a três genótipos: *A/A* (normal), *A/S* (portadores heterozigotos) e *S/S* (anemia falciforme). Em uma amostra de 12.387 indivíduos da população adulta do oeste de África, os três genótipos foram detectados nas seguintes proporções: 9.365 *A/A*:2.993 *A/S*:29 *S/S*. Contando os alelos *A* e *S* nestes três genótipos, podemos determinar as freqüências alélicas como sendo de $p = 0,877$ para o alelo *A* e de $q = 0,123$ para o alelo *S*. No equilíbrio de Hardy-Weinberg a proporção dos genótipos deveria ser *A/A*:*A/S*:*S/S* = p^2: $2pq$:q^2 = 9.527:2.672:188. As proporções observadas, entretanto, *A/A*:*A/S*:*SS* = 9.365:2.993:29, diferem significativamente do esperado. O exemplo do alelo falciforme ilustra como as forças da seleção, operando não só no genótipo relativamente raro *S/S*, mas também nos outros dois, muito mais freqüentes, *A/A* e *A/S*, distorcem a transmissão dos alelos *A* e *S* e causam um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma população.

Uma situação na qual as forças seletivas operam tanto para manter um alelo deletério quanto para removê-lo do *pool* gênico é descrita como um **polimorfismo balanceado**. Espera-se que uma mudança na pressão seletiva ocasione uma mudança rápida na freqüência relativa do alelo. Hoje em dia, muitos heterozigotos para a anemia falciforme vivem em regiões que não têm malária, e mesmo nas áreas com malária, grandes esforços estão sendo feitos para erradicar o mosquito responsável pela transmissão da doença. Há uma evidência de que, na população afro-americana dos EUA, a freqüência do gene falciforme já pode estar caindo em relação ao seu alto nível na população africana imigrante original de várias gerações atrás, embora outros fatores, tais como a introdução de genes de populações não-africanas no *pool* de genes afro-americano, também possam ter um papel.

Também se acredita que alguns outros alelos deletérios, incluindo os genes para a hemoglobina C, as talassemias e a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (ver Cap. 12), bem como o alelo benigno *FY* do grupo sanguíneo Duffy, sejam mantidos em suas atuais altas freqüências em algumas populações em função da proteção que dão contra a malária.

A vantagem dos heterozigotos também foi proposta para explicar as altas freqüências da fibrose cística nos caucasianos e da doença de Tay-Sachs e outros distúrbios que afetam o metabolismo de esfingolipídeos na população de judeus Ashkenazi. Entretanto, a deriva genética (discutida mais adiante) é outro mecanismo poderoso para a alteração de freqüências gênicas e pode contribuir adequadamente para as freqüências incomumente altas que alguns genes deletérios atingem em alguns ambientes. Para a fibrose cística e a doença de Tay-Sachs, a questão permanece sem solução.

Deriva Genética

Outra causa das altas freqüências para alelos de doenças deletérias em uma população é um fenômeno conhecido como **deriva genética**, a flutuação de freqüência alélica aleatória que opera em um pequeno *pool* de genes contido em uma população pequena. Por exemplo, quando ocorre uma mutação nova, sua freqüência é representada por apenas uma cópia entre todas as cópias deste gene na população. Se a população é pequena, fatores aleatórios, tais como a fertilidade aumentada ou a sobrevida, ou ambos, do portador da mutação, que *ocorram por motivos não-relacionados ao fato de o indivíduo ser portador do alelo mutante*, podem fazer com que a freqüência alélica suba por motivos que não têm nada a ver com a mutação em si. Em uma grande população, tais efeitos aleatórios tenderiam a uma média, mas nas populações pequenas as freqüências alélicas podem flutuar de geração para geração pelo acaso. De modo semelhante, quando uma pequena subpopulação separa-se de uma maior, as freqüências gênicas na população menor podem ser bem diferentes daquelas da população da qual se originou, pois o novo grupo contém uma amostra pequena e aleatória do grupo parental e, por acaso, pode não ter as mesmas freqüências gênicas que o grupo parental. Nas gerações seguintes, embora o tamanho da população do novo grupo permaneça pequeno, pode haver uma considerável flutuação de freqüência gênica. Estas mudanças provavelmente se diluem à medida que a população aumenta.

Uma forma de deriva genética é o **efeito do fundador**: se um dos fundadores originais de um novo grupo tiver um alelo relativamente raro, este alelo terá uma freqüência maior do que tinha no grupo maior do qual este pequeno grupo se originou. Um exemplo é a alta incidência da doença de Huntington na região do lago Maracaibo, na Venezuela (ver Cap. 12), mas existem outros numerosos exemplos do efeito do fundador envolvendo outros alelos de doença em isolados genéticos pelo mundo.

O efeito do fundador é bem ilustrado pela Old Order Amish, um isolado religioso de descendência européia que se instalou na Pensilvânia e originou um número pequeno — e geneticamente isolado — de subpopulações por todo os EUA e o Canadá. A Old Order Amish tende a ter grandes famílias e uma alta freqüência de casamentos consangüíneos. A incidência de síndromes autossômicas recessivas raras, tais como a **síndrome de Ellis-van Creveld** (Fig. 7.1), em algumas comunidades Amish, mas não em outras, é uma ilustração do efeito do fundador.

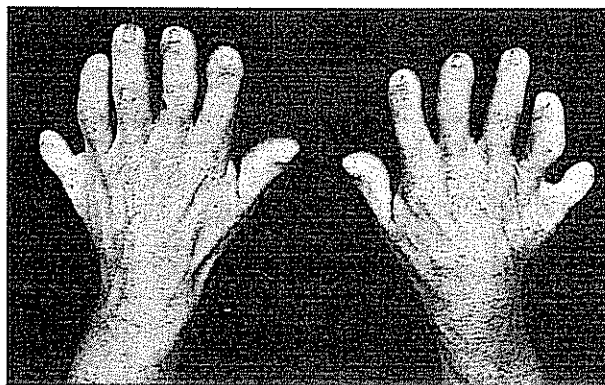



Fig. 7.1 As mãos de um paciente com a síndrome de Ellis-van Creveld, um distúrbio muito raro visto com freqüência aumentada em alguns grupos Amish. (Foto por cortesia de David Rimoin. Cedars-Sinai Medical Center. Los Angeles.)

Outro exemplo marcante do efeito do fundador é dado pela população de africânderes da África do Sul. A população foi estabelecida por 20 casais originais, principalmente da Holanda, ao longo de algumas décadas começando em 1652, e teve um crescimento explosivo em seus primeiros anos. Hoje em dia, quase 1 milhão dos 2.500.000 africânderes têm os sobrenomes dos 20 fundadores originais. Um dos fundadores trouxe o gene para **porfiria variegada** (VP), um distúrbio autossômico dominante de início relativamente tardio. A VP resulta da deficiência da enzima protoporfirinogênio oxidase, que é da via de síntese de heme. Os heterozigotos desenvolvem fotossensibilidade e sintomas neuroviscerais, induzidos por barbituratos e outros fatores. Os homozigotos têm um distúrbio mais grave, com início mais cedo e retardo de crescimento e desenvolvimento mental. Hoje em dia a VP na África do Sul é de aproximadamente 1/333. A incidência da VP na Holanda é desconhecida, mas foi determinada como sendo de cerca de 1/100.000 na Finlândia.

A população franco-canadense do Canadá também tem freqüências altas de alguns distúrbios que são raros em outras partes. Uma doença característica da região relativamente isolada do Lac Saint Jean de Quebec é a **tirosinemia tipo I** hereditária. Esta condição autossômica recessiva causa insuficiência hepática e disfunção tubular renal causada por deficiência de fumarilacetoacetase, uma enzima da via de degradação da tirosina. A doença tem uma freqüência geral de cerca de 1/100.000 em outras partes de Quebec e na Noruega e na Suécia, mas sua freqüência é de 1/685 no Lac Saint Jean, onde o efeito do fundador foi demonstrado.

A população da Finlândia, por muito tempo isolada geneticamente pela geografia, linguagem e cultura, expandiu-se nos últimos 300 anos de 400.000 para cerca de 5 milhões de pessoas. O isolamento e a expansão populacional permitiram que a população da Finlândia desenvolvesse um padrão distinto de distúrbios monogênicos. Há uma alta freqüência de pelo menos 20 doenças que são raras em outras partes. Por exemplo, a **coroideremia**, uma doença ocular degenerativa ligada ao X, é muito rara no resto do mundo. Apenas cerca de 400 casos foram descritos. Um terço do número total de pacientes, entretanto, é de uma pequena região da Finlândia, povoada por uma grande família ampliada que descendeu de uma dupla fundadora nascida na década de 1640 (Fig. 7.2). Outra doença genética finlandesa é a hiperornitinemia com **atrofia de giro** da coróide e retina, uma condição autossômica recessiva causada pela deficiência de ornitina aminotransferase e que leva à perda de visão em adultos jovens (ver Fig. 7.2). Como se poderia esperar com um efeito do fundador, foi encontrada uma mutação na forma homozigota na grande maioria de casos aparentemente não-relacionados de atrofia de giro na Finlândia, mas não foi observada em todos os casos não-finlandeses. Contrariamente, os distúrbios que são comuns em outras populações européias, tais como a PKU, são bem raros na Finlândia.

Assim, um dos resultados do efeito do fundador e da deriva genética é que cada população pode ser caracterizada por suas mutações moleculares particulares, bem como por um aumento ou uma diminuição de doenças específicas. Como mostram estes exemplos, a deriva genética pode favorecer o estabelecimen-

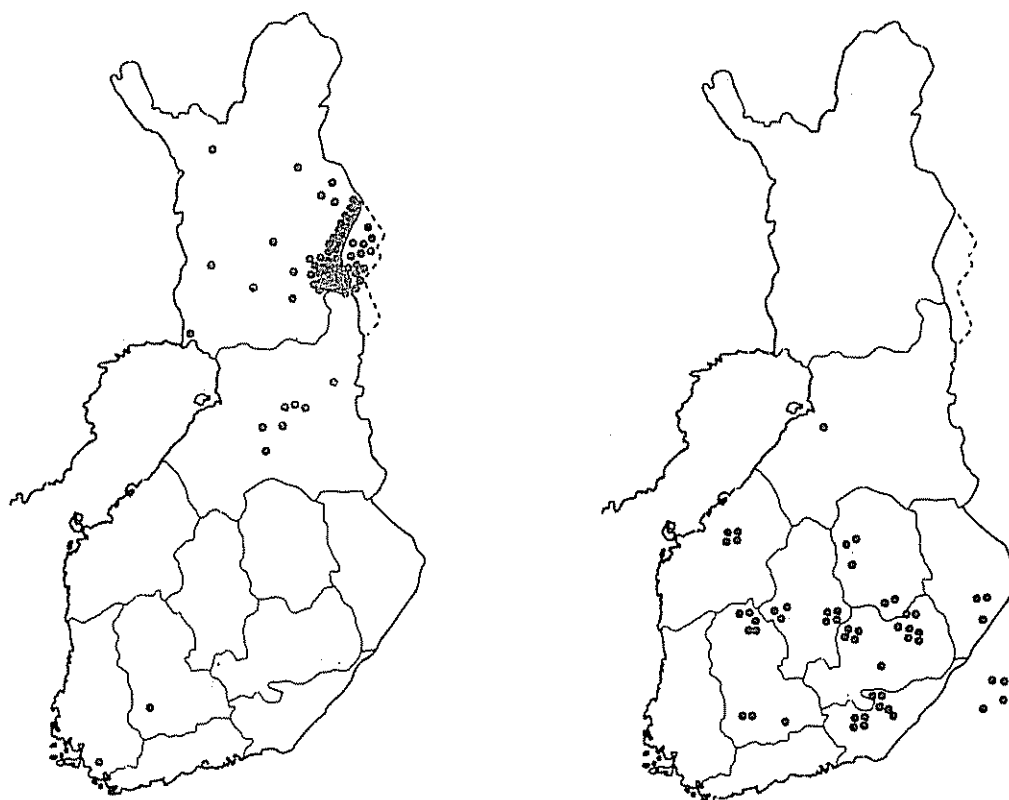



Fig. 7.2 A origem geográfica de casos de dois distúrbios genéticos prevalecentes na Finlândia: a coroideremia ligada ao X (*esquerda*) e a hiperornitinemia com atrofia de giro da coróide e retina (*direita*). A maioria dos casos de cada doença originou-se de determinadas comunidades na Finlândia, mas as distribuições das doenças diferem. (Baseada em Mitchell G.A., Brody L.C., Sipila I., *et al* [1989] At least two mutant alleles of ornithine-δ-aminotransferase cause gyrate atrophy of the choroid and retina in Finns. Proc Natl Acad Sci USA 86:197-201; e Nario R., Nevanlinna H.R., Perheentupa J. [1973] Hereditary diseases in Finland: Rare flora in rare soil. Ann Clin Res 5:109-141.)

to de uma alta incidência de alelos que não são favoráveis ou mesmo neutros, mas sim prejudiciais. A mobilidade relativa da maioria das populações atuais, em comparação com seus ancestrais de apenas algumas gerações, pode reduzir o efeito da deriva genética no futuro.

Fluxo Gênico

Em contraste com a deriva genética, que leva a uma variação aleatória nas freqüências alélicas de populações pequenas, o **fluxo gênico** é definido como a lenta difusão de genes através de uma barreira, um processo que envolve uma grande população e uma mudança gradativa nas freqüências gênicas. Os genes das populações migrantes, com suas próprias freqüências gênicas características, são gradualmente dispersos no *pool* gênico da população para a qual migraram. (O termo "migrante" é usado aqui no sentido amplo de cruzar uma barreira reprodutiva, que pode ser racial, étnica ou cultural, e não necessariamente geográfica, requerendo um movimento físico de uma região para outra.) Enquanto o mecanismo da deriva genética é aleatório, o do fluxo gênico é de mistura populacional.

As freqüências da deleção de 32 pares de bases do alelo do gene de receptor de citocina *CCR5*, Δ*CCR5*, foram estudadas em muitas populações pelo mundo. A freqüência do alelo Δ*CCR5* declina de cerca de 10% no leste europeu e na Rússia para alguns poucos por cento no Oriente Médio e na Índia subcontinental. O alelo Δ*CCR5* está absolutamente ausente na África e no Extremo Oriente, o que sugere que a mutação originou-se nos caucasianos e difundiu-se para as outras populações (Fig. 7.3).

Os gradientes noroeste e sudeste de freqüência do alelo Δ*CCR5*, logicamente, não explicam por que a freqüência alélica é tão alta como é no noroeste da Europa. Por exemplo, a freqüência mais alta do alelo Δ*CCR5* é de 21%, vista nos judeus Ashkenazi, e quase tão alta na Islândia e nas ilhas britânicas. A atual pandemia de AIDS é muito recente para ter afetado as freqüências gênicas por seleção. A variação nas freqüências alélicas da própria Europa é mais coerente com a deriva genética agindo em um polimorfismo neutro, embora seja possível que outro fator seletivo (talvez outra doença infecciosa, tal como a peste bubônica) possa ter elevado a freqüência do alelo Δ*CCR5* nas populações do nordeste da Europa durante um intenso período de seleção.

Um outro exemplo de fluxo gênico entre grupos populacionais é o que se reflete na freqüência de alelos específicos que causam PKU. Há uma forte evidência de que as mutações mais comuns originaram-se dos celtas. As mesmas mutações surgiram em muitas populações ao redor do mundo. A presença dos mesmos alelos em populações diferentes reflete a migração geográfica dos celtas. Assim, a freqüência de PKU é de cerca de 1/4.500 na Irlanda, mas o distúrbio é progressivamente menos prevalecente no nordeste e no sudeste da Europa. Tem havido um fluxo consideravelmente menor de genes do leste da Ásia; a incidência de PKU no Japão é de apenas cerca de 1/109.000.

CONCLUSÃO

Uma descrição matemática do comportamento dos genes nas populações é um elemento importante de muitas disciplinas, incluindo a antropologia, a biologia evolutiva e a genética humana. Na genética médica prática, a aplicação da genética de populações tem sido principalmente prática: fornecendo freqüências alélicas para cálculos de risco. No momento, os estudantes de genética humana estão usando os princípios e os métodos da genética de populações para abordar muitas dúvidas sem resposta quanto à estrutura genética de populações humanas, o fluxo de genes entre as populações e entre as gerações e os métodos ideais para a identificação das contribuições genéticas para doenças comuns (ver Cap. 15). Uma compreensão dos princípios da genética de populações se tornará mais e mais importante à medida que os testes genéticos e as tecnologias terapêuticas ampliarem o impacto dos cuidados da genética médica na saúde pública e no risco de doenças genéticas nas futuras gerações (ver Cap. 20).

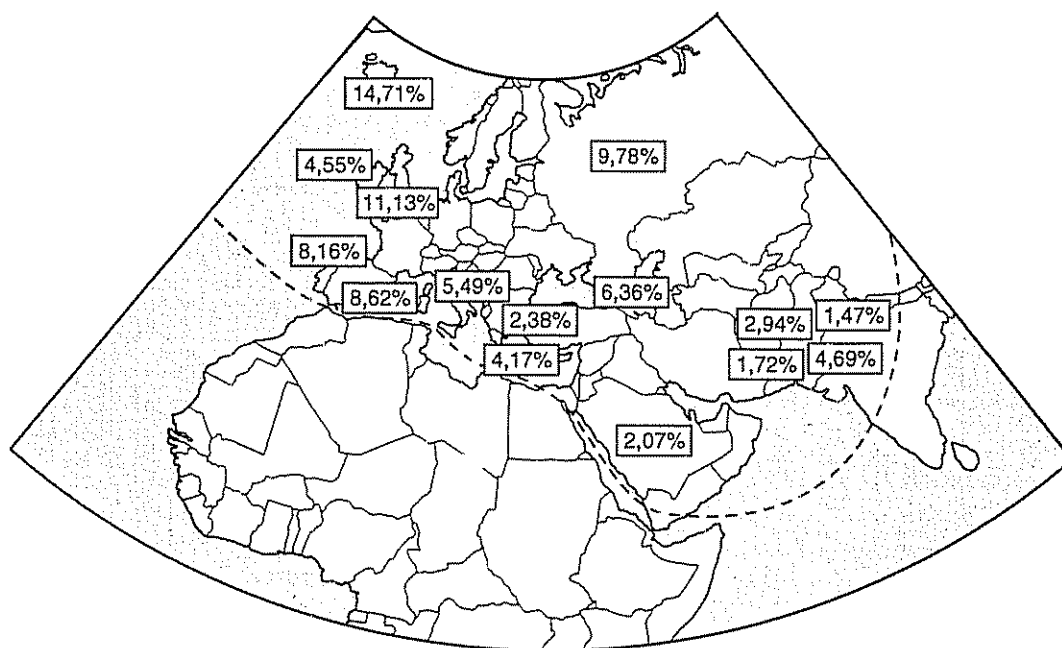



Fig. 7.3 Freqüência dos alelos Δ*CCR5* nas populações da Europa, África e Ásia. (Reproduzida com permissão de Martinson J J, Chapman N H, Rees D C, *et al* [1997] Global distribution of the *CCR5* gene 32 basepair deletion. Nat Genet 16:100-103.)

Referências Gerais

Cavalli-Sforza LL (1998) The DNA revolution in population genetics. Trends Genet 14:60–65

de la Chapelle A (1993) Disease gene mapping in isolated human populations: The example of Finland. J Med Genet 30:857–865

Emery AEH (1986) Methodology in Medical Genetics, 2nd ed Churchill Livingstone, Edinburgh

Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, England.

Li CC (1975) First Course in Population Genetics. Boxwood Press, Pacific Grove, California

Morton NE (1982) Outline of Genetic Epidemiology. Karger, Basel.

Peltonen L, Uusitalo A (1997) Rare disease genes—lessons and challenges. Genome Res 7:65–767.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Lorey FW, Arnopp J, Cunningham GC (1996) Distribution of hemoglobinopathy variants by ethnicity in a multiethnic state. Genet Epidemiol 13:501–512.

Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, et al (1997) Global distribution of the *CCR5* gene 32 basepair deletion. Nat Genet 16:100–103.

Nagel RL, Ranney H (1990) Genetic epidemiology of structural mutations of the β-globin gene. Semin Hematol 27:342–359.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I (1997) Cytochrome P450 2D6 variants in a caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences. Am J Human Genet 60:284–295.

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, et al (1998) Dating the origin of the CCR5-delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. Am J Human Genet 62:1507–1515

Tada K, Tateda H, Arashima S, et al (1984) Follow-up study of a nation-wide neonatal metabolic screening program in Japan. A collaborative study group of neonatal screening for inborn errors of metabolism in Japan. Eur J Pediatr 142:204–207.

Problemas

1. Em uma população em equilíbrio, três genótipos estão presentes nas seguintes proporções: *A/A*, 0,81; *A/a* 0,18; *a/a* 0,01.
   (a) Quais as freqüências de *A* e *a*?
   (b) Quais serão suas freqüências na próxima geração?
   (c) Que proporção de todos os casamentos nesta população é de *A/a* × *A/a*?

2. Em um programa de triagem para detectar portadores de β-talassemia em uma população italiana, a incidência encontrada foi de cerca de 4%. Calcule
   (a) a freqüência do alelo de β-talassemia (supondo que há uma só mutação comum de β-talassemia nesta população);
   (b) a proporção de casamentos nesta população que podem produzir um filho afetado;
   (c) a incidência de fetos afetados ou neonatos nesta população;
   (d) a incidência de β-talassemia entre a prole de casais em que ambos são heterozigotos.

3. Quais das seguintes populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg?
   (a) *A/A*, 0,70; *A/a*, 0,21; *a/a*, 0,09.
   (b) Grupos sanguíneos MN: (i) M, 0,33; MN, 0,34; N, 0,33. (ii) 100% MN.
   (c) *A/A*, 0,32; *A/a*, 0,64; *a/a*, 0,04.
   (d) *A/A*, 0,64; *A/a*, 0,32; *a/a*, 0,04.
   Que explicações você pode dar para as freqüências nestas populações que *não* estão em equilíbrio?

4. Você é consultado por um casal, Abby e Andrew, que lhe diz que a irmã de Abby, Anna, tem síndrome de Hurler (uma mucopolissacaridose) e que está preocupado com a possibilidade de ter um filho com o mesmo distúrbio. A síndrome de Hurler é uma condição autossômica recessiva com uma incidência populacional de cerca de 1 em 90.000 em sua comunidade.
   (a) Se Abby e Andrew não forem consangüíneos, qual será o risco de o primeiro filho deles ter a síndrome de Hurler?
   (b) Se eles forem primos em primeiro grau, qual será o risco?
   (c) Como suas respostas a estas questões difeririam se a doença em questão fosse a fibrose cística, em vez da síndrome de Hurler?

5. Em uma determinada população, três distúrbios — retinoblastoma autossômico dominante, ataxia de Friedreich autossômica recessiva (um distúrbio neuromuscular) e coroideremia ligada ao X (uma causa de perda de visão nos homens em idade jovem) — têm cada um uma freqüência populacional de aproximadamente 1/25.000.
   (a) Quais as freqüências gênicas e de heterozigotos para cada distúrbio?
   (b) Suponha que cada um possa ser tratado de forma bem-sucedida, de modo que toda a seleção contra ele seja removida. Qual seria o efeito na freqüência gênica em cada caso? Por quê?

6. Como foi discutido neste capítulo, a condição autossômica recessiva tirosinemia tipo I tem uma incidência observada de 1/685 indivíduos em uma população da província de Quebec, mas uma incidência de cerca de 1/100.000 em outra parte. Qual a freqüência do alelo mutante de tirosinemia nestes dois grupos?

7. Para a população de Quebec na questão 6, você esperaria que os alelos mutantes de tirosinemia fosse homogêneos ou heterogêneos? E quanto aos casos de neurofibromatose I autossômica dominante na mesma população franco-canadense? E a distrofia muscular Duchenne ligada ao X? E daltonismo ligado ao X?

8

Mapeamento Gênico e o Projeto do Genoma Humano

O mapeamento do genoma humano é uma das áreas do estudo da genética médica em mais rápida expansão hoje em dia. Ter o mapa gênico humano completo é conhecer a localização de aproximadamente 50.000 genes nos 24 cromossomos, suas posições relativas uns aos outros e as distâncias entre eles. Tal informação de mapa é extremamente valiosa não apenas porque pode ser aplicada ao diagnóstico de doenças e à consulta genética, mas também porque fornece uma via direta para identificar os genes responsáveis por doenças genéticas.

No início, a localização cromossômica era feita exclusivamente com estudos familiares de grandes heredogramas para avaliar o modo de herança. Desta forma, os genes para características ligadas ao X podiam ser situados no cromossomo X porque as características apresentavam um padrão único de transmissão. Além disso, algumas características autossômicas dominantes ou co-dominantes foram atribuídas a autossomos individuais por causa da descoberta fortuita de que o fenótipo da característica foi herdado por muitas gerações em tandem com um determinado grupo sanguíneo ou com um cromossomo com uma variante estrutural citogeneticamente detectável (**heteromorfismo**; ver Cap. 9). A grande maioria dos genes humanos, entretanto, não podia ser mapeada deste ou de qualquer outro modo até o advento da metodologia do mapeamento físico e genético, o assunto deste capítulo.

Existem dois enfoques fundamentalmente diferentes para criar mapas gênicos de cromossomos humanos: o mapeamento físico e o mapeamento genético. O **mapeamento físico** situa os genes em determinados locais ao longo de um cromossomo usando medidas que são um reflexo da distância física entre os genes. Em baixa resolução, os mapas físicos colocam os genes nos cromossomos ou em regiões de um cromossomo de acordo com as bandas citogenéticas em cromossomos metafásicos. Na maior resolução, o mapeamento físico fornece os locais e as distâncias entre os genes nas medidas físicas reais, tais como o tamanho do DNA (em unidades de pares de bases). O **mapeamento genético**, por outro lado, usa um método totalmente diferente, chamado de **análise de ligação**, para determinar a distância entre os genes. A análise de ligação é baseada em medir a freqüência com a qual dois genes ficam juntos (permanecem ligados) através da meiose à medida que são transmitidos de uma geração para a seguinte. Neste capítulo, discutiremos ambos os tipos de mapeamento e examinaremos várias de suas aplicações para identificar e isolar determinados genes humanos e dar informações diagnósticas em genética médica.

MAPEAMENTO FÍSICO DOS GENES HUMANOS

O mapeamento físico dos genes engloba uma variedade de métodos diferentes, cada um dos quais usa unidades de medida diferentes e fornece níveis de resolução diferentes, variando de um cromossomo inteiro a um único par de bases.

Genética de Células Somáticas

A genética de células somáticas é o estudo da organização gênica, da expressão e da regulação em células cultivadas obtidas de tecidos somáticos, em oposição à linhagem germinativa. A genética de células somáticas tira proveito da capacidade que vários tipos celulares diferentes têm de crescer, às vezes indefinidamente, em cultura de células. A manutenção bem-sucedida das culturas por longos períodos requer o desenvolvimento de meios que satisfaçam os restritos requisitos nutricionais das células, bem como o início de precauções para evitar a contaminação por microrganismos, leveduras ou outras linhagens celulares cultivadas.

A cultura de células demonstrou-se útil em muitas situações. A técnica permite a propagação de uma única célula de constituição genética definida para obter um grande número de células (clones), geneticamente idênticas à célula original, disponíveis para estudo. Uma linhagem celular pode ser obtida de um paciente com um raro distúrbio ou um cariótipo incomum quando o paciente está disponível e a amostra pode ser congelada mais ou menos permanentemente em nitrogênio líquido para estudo em uma época conveniente, mesmo décadas após a morte do paciente.

Os fibroblastos, em geral cultivados a partir de pequenas amostras de pele, estão entre os tipos celulares mais úteis para os estudos de genética de células somáticas. Os fibroblastos têm um aspecto fusiforme, crescem em monocamadas aderidas a superfícies de plástico ou vidro e dividem-se por cerca de 30 a 100 gerações até que se tornem incapazes de novas divisões (**senescência**). Algumas linhagens celulares em cultura sofrem **transformação**, o que significa que as células assemelham-se a células cancerosas em sua capacidade de crescer indefinidamente. A transformação pode ser espontânea ou induzida por vírus, tais como o Epstein-Barr. Este vírus é hoje rotineiramente

usado para transformar linfócitos de sangue periférico para criar linhagens celulares linfoblastóides imortalizadas, pois as amostras de sangue são relativamente fáceis de se obter e o processo de transformação é rápido e eficiente. As linhagens transformadas não sofrem senescência e podem reter parte das características diferenciadas das células a partir das quais foram obtidas, mas, com a notável exceção das células linfoblastóides, a maioria das linhagens transformadas não mantém um cariótipo euplóide normal.

Mapeamento por Transferência Cromossômica

A transferência cromossômica é um método laboratorial poderoso que permite que cromossomos inteiros, ou segmentos de cromossomos, sejam transferidos de uma célula doadora para uma célula receptora em cultura. Tão logo ficou claro que as células humanas e outras células de mamíferos podem ser mantidas em cultura, os geneticistas humanos começaram a transferir cromossomos das células de uma espécie para células de outra espécie para separar genes diferentes e seus alelos em clones separados de células. *Pela correlação de que genes estão presentes em uma célula receptora quando cromossomos específicos ou segmentos cromossômicos foram transferidos, a localização cromossômica dos genes transferidos pode ser determinada.*

Hibridização de Células Somáticas

O enfoque mais amplamente usado para a transferência cromossômica é fundir células somáticas de espécies diferentes para fazer **células somáticas híbridas** interespecíficas. Quando uma mistura de células somáticas humanas e de roedor, cultivadas em monocamadas ou em suspensão, é exposta a agentes que promovem a fusão das membranas celulares, duas células podem se fundir em uma única célula híbrida. Imediatamente após a fusão, os dois núcleos são mantidos separados no mesmo citoplasma (Fig. 8.1). Se os híbridos recém-formados forem híbridos interespecíficos, isto é, contiverem núcleos de células de roedor e humana, eles serão conhecidos como **heterocárions**. (**Homocárions** são híbridos que contêm núcleos da mesma espécie.) Após um heterocárion sofrer mitose e divisão celular, os dois conteúdos nucleares unem-se em um único núcleo "híbrido" e, com as posteriores divisões celulares, perdem um número variável de cromossomos humanos aleatoriamente dos híbridos humano/roedor. Os cromossomos do roedor não são perdidos, por motivos ainda desconhecidos.

Como uma conseqüência da perda aleatória de cromossomos humanos, diferentes células híbridas filhas contêm números diferentes, bem como combinações diferentes, de cromossomos humanos. Cada clone independente de células híbridas pode ser isolado e analisado quanto ao seu conteúdo de cromossomos humanos usan-

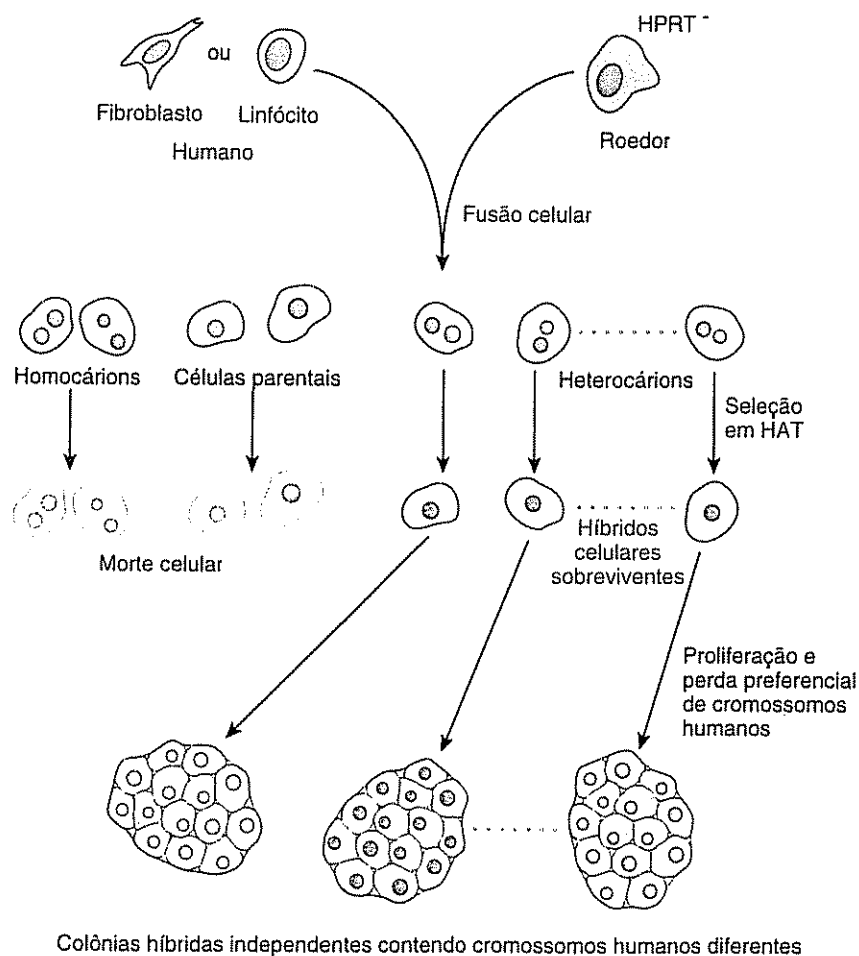



Fig. 8.1 Esquema de hibridização interespecífica de células somáticas. Após a fusão celular, os clones híbridos de células somáticas humana/roedor são cultivados em um sistema de seleção, tal como o meio hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Estes híbridos celulares preferencialmente perdem cromossomos humanos, o que torna possível isolar clones híbridos contendo combinações diferentes de cromossomos humanos. Estes clones podem então ser analisados quanto à presença ou ausência de um determinado gene humano, permitindo assim a localização do gene em um cromossomo humano específico.

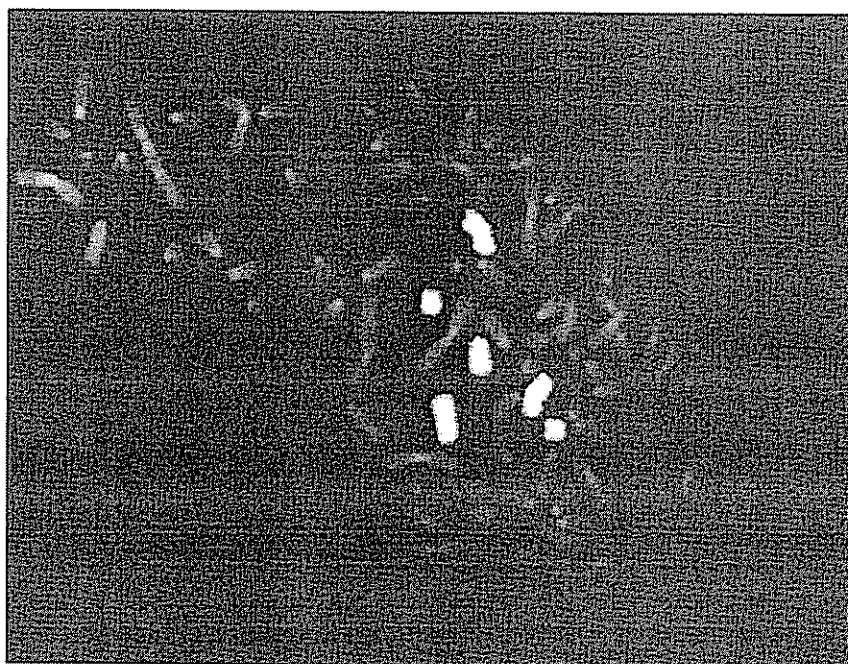



Fig. 8.2 Metáfase cromossômica de uma célula híbrida camundongo/humana Os cromossomos humanos podem ser identificados por um método de detecção que marca especificamente o DNA humano mas não o de camundongo Este híbrido contém seis cromossomos humanos. identificados como cromossomos 13. 20 (duas cópias) e o X (três cópias) (Cortesia de V E Powers. Stanford University)

do várias técnicas de cariotipagem que distinguem os cromossomos humanos dos cromossomos de roedor (ver Figs 8.1 e 8.2).

A fusão de células somáticas não é eficiente: a maioria das células em cultura não se fundem e, para as que o fazem, não há um método para garantir que uma célula humana tenha sempre se fusionado a uma célula de roedor e não a outra célula humana (e vice-versa para as células de roedor). Determinadas condições e técnicas de cultura celular são usadas para tornar não-fusionáveis os tipos celulares parentais e os híbridos derivados de homocárions incapazes de sobrevida, enquanto permitem que os híbridos formados de heterocárions sobrevivam e cresçam. Embora vários esquemas seletivos tenham sido desenvolvidos, um dos primeiros e mais comumente usados envolve a seleção em meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (o chamado meio HAT). As células só podem crescer em meio HAT se possuírem a enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT), que poupa a base purínica hipoxantina contida no meio HAT para a síntese do DNA (ver Fig. 12.3). As células deficientes em atividade de HPRT ($HPRT^-$) devem produzir as bases purínicas de novo e, portanto, não podem sobreviver em meio HAT, pois a aminopterina inibe a biossíntese de novo de purina (bem como de pirimidina).

Quando linhagens celulares de roedores $HPRT^-$ (em geral camundongo ou *hamster*) fundem-se com células humanas $HPRT^+$, apenas os híbridos de células somáticas roedor/humano são capazes de crescimento prolongado em meio HAT: tanto a linhagem parental de roedor $HPRT^-$ quanto qualquer homocárion formado a partir delas morre em HAT. As células parentais humanas e os homocárions delas derivados não sobrevivem porque não são transformados e não têm potencial de crescimento a longo prazo (ver Fig. 8.1).

Painéis de Mapeamento de Células Somáticas Híbridas

A perda ou retenção aleatória de cromossomos humanos em híbridos interespecíficos de células somáticas resulta em clones contendo subgrupos diferentes de cromossomos humanos. Um conjunto de clones híbridos independentes de células somáticas, chamados de **painel**, pode ser usado para mapear um gene ou um segmento de DNA humano em um determinado cromossomo simplesmente testando-se os híbridos no painel, cada um dos quais leva cromossomos humanos diferentes, quanto à presença ou ausência de um determinado gene humano. Os resultados são comparados aos cromossomos humanos residuais presentes em cada híbrido, para determinar a concordância entre a presença de um determinado cromossomo e a presença do gene. Deste modo, por exemplo, a presença ou ausência do gene para hexosaminidase A (*HEXA*), na qual as mutações causam a doença de Tay-Sachs (ver Cap. 12), demonstrou ser correlata à presença do cromossomo humano 15 em um painel de híbridos de células somáticas (Quadro 8.1). Todos os híbridos que conservavam o cromossomo humano 15 continham o gene humano *HEXA* e todos aqueles sem o cromossomo 15 não continham *HEXA* humana. Esta concordância perfeita foi observada apenas para o cromossomo 15 e não para qualquer outro cromossomo humano, permitindo, assim, a localização do gene *HEXA* no cromossomo 15. Neste tipo de análise, a presença de um gene humano pode ser monitorada medindo-se sua atividade bioquímica se o gene for expresso em híbridos de células somáticas e se as atividades humanas e de roedores puderem ser diferenciadas. Os métodos do DNA que distinguem o gene humano do gene de roedor agora são usados mais comumente (Fig. 8.3). Estes métodos incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) com pares de *primers* específicos de humanos *versus* roedores e a transferência de Southern para visualizar as diferenças de comprimento de fragmentos de restrição que distinguem as seqüências de DNA de humanos e de roedores. Este tipo de análise de concordância em um painel de híbridos interespecíficos de células somáticas permitiu que milhares de genes fossem situados em cromossomos humanos individuais.

QUADRO 8–1

Mapeamento de Gene Humano Usando-se Híbridos de Células Somáticas

		Cromossomos Humanos																							
Híbrido	*HEXA Gene*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*	*13*	*14*	*15*	*16*	*17*	*18*	*19*	*20*	*21*	*22*	*X*	*Y*
I	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−
II	−	+	+	−	+	−	−	+	+	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−	+	−
III	+	−	−	−	+	−	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+
IV	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−	+	−
V	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+
VI	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	+	−	+	−	+	−
VII	+	+	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−
VIII	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−

Nota: Um painel de híbridos de células somáticas camundongo/humana, cada um contendo de 2 a 13 cromossomos humanos, foi usado para testes quanto à presença ou ausência do gene humano de hexosaminidase A (*HEXA*) por meio de transferência de Southern de DNA preparado a partir dos híbridos (ver Fig. 8.3). Há uma correlação perfeita entre a presença ou ausência de *HEXA* e a presença ou ausência do cromossomo humano 15. Para todos os outros cromossomos humanos, existem híbridos que contêm *HEXA*, mas não têm o cromossomo, e existem híbridos que contêm o cromossomo, mas não têm *HEXA*. Assim, estes resultados indicam que o gene *HEXA* deve estar no cromossomo humano 15.

Mapeando um Gene em uma Região Específica de um Cromossomo

Os estudos usando híbridos humano/roedor permitem a atribuição de um gene a um determinado cromossomo. Uma resolução adicional pode ser obtida isolando-se os cromossomos estruturalmente anormais, tais como os descritos nos Caps. 9 e 10, em híbridos de células somáticas. Se um determinado gene estiver presente apenas nos híbridos com um cromossomo deletado ou translocado, então o gene poderá ser localizado na parte do cromossomo retida nos híbridos. Alternativamente, se soubermos que um gene está mapeado em um determinado cromossomo mas está ausente de um híbrido contendo uma cópia deletada ou translocada deste cromossomo, então o gene poderá ser atribuído à parte do cromossomo que está faltando. A Fig. 8.4 mostra como dois cromossomos X estruturalmente anormais são usados no mapeamento gênico para localizar genes ligados ao X e seqüências de DNA em determinadas regiões do cromossomo X. Examinando-se híbridos diferentes, cada um contendo um dos cromossomos translocados, o cromossomo X pode ser dividido em três intervalos, e genes diferentes atribuídos a cada um. A ampliação desta estratégia e o exame de regiões cada vez menores do cromossomo de interesse nos híbridos possibilitou localizar genes em regiões ainda menores.

Mapeamento de Híbridos de Radiação

Embora a hibridização de células somáticas de cromossomos estruturalmente anormais possa fornecer a localização regional de um gene em uma determinada parte de um cromossomo, as regiões cromossômicas definidas ainda são muito grandes em comparação com o tamanho de um gene médio. O mapeamento gênico de resolução ainda maior pode ser obtido com o **mapeamento híbrido de radiação**, uma técnica de hibridização de células somáticas que tira proveito da capacidade dos raios X de causar quebras bifilamentares no DNA. As células humanas recebem raios X para quebrar seus cromossomos, e os fragmentos são separados em um grande número de híbridos por fusão de células somáticas com células de roedor $HPRT^-$. Os híbridos contendo fragmentos de cromossomos humanos podem ser isolados por seleção em HAT, pois os híbridos que contêm o fragmento do cromossomo X levando *HPRT* invariavelmente também contêm um conjunto aleatório de fragmentos de outros cro-

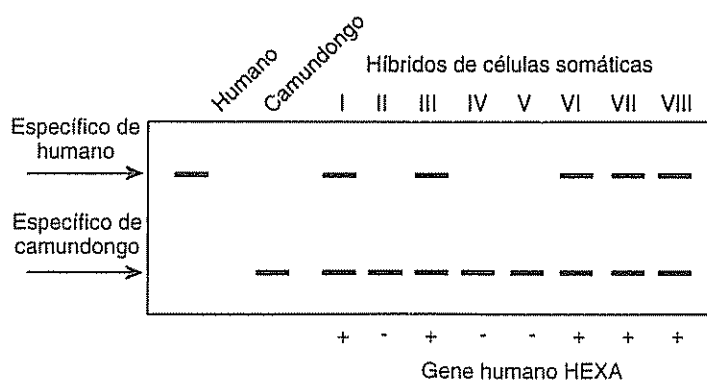



Fig. 8.3 Eletroforese em gel de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para mapear o gene humano *HEXA* no cromossomo 15, em uma série de híbridos de células somáticas camundongo/humana. Apenas os híbridos I, III, VI, VII e VIII contêm seqüências humanas *HEXA*, as quais podem ser diferenciadas das seqüências gênicas de camundongo pelo uso de pares de *primers* diferentes para PCR que são específicos da seqüência humana ou da seqüência de camundongo e amplificam fragmentos de tamanhos diferentes nas duas espécies. Os fragmentos específicos de humanos e camundongo são então separados por eletroforese em gel.

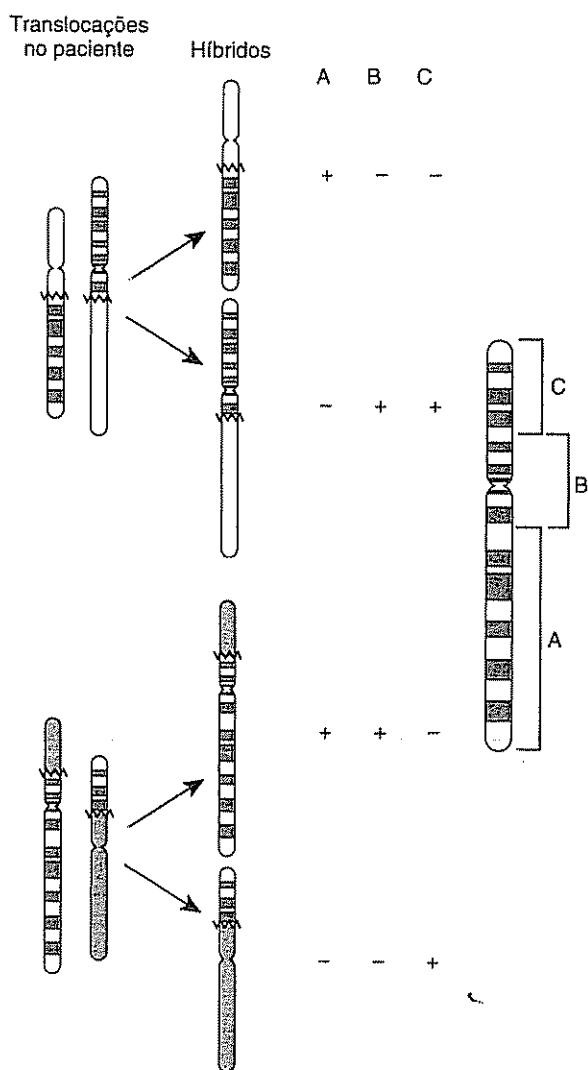



Fig. 8.4 Mapeamento regional de genes ligados ao X por análise de cromossomos de translocação X;autossomo em híbridos de células somáticas. Os produtos recíprocos de duas translocações X;autossomo diferentes são segregados em clones de híbridos de células somáticas e podem ser analisados quanto à presença ou ausência de genes do cromossomo X humano. Os resultados combinados permitem a localização regional dos três genes em partes diferentes do X, como indicado à direita.

mossomos humanos (Fig. 8.5). As células humanas não-fusionadas ou homocários humanos morrem por intenso dano cromossômico, enquanto as células de roedores HPRT$^-$ não-fusionadas ou homocários de roedores morrem em HAT.

Quanto mais perto dois genes humanos estiverem em um cromossomo, menos provável será que ocorra uma quebra induzida por raios X entre eles. Como resultado, dois genes em proximidade física são retidos em muitos dos mesmos híbridos, enquanto os genes que não estão próximos em geral residem em fragmentos cromossômicos diferentes e, portanto, normalmente não estão presentes nos mesmos híbridos. Uma análise estatística de com que freqüência dois genes estão presentes em clones híbridos de radiação nos dá uma medida da distância entre os genes. A resolução do mapeamento de híbridos de radiação pode ser ajustada usando-se doses menores ou maiores de raios X para gerar freqüências de quebras diferentes e, portanto, fragmentos de tamanhos variados.

Mapeamento por Dosagem Gênica Usando Células de Pacientes

Um outro enfoque do mapeamento gênico também tira proveito de cromossomos estruturalmente rearranjados, mas não se baseia em primeiro separar os cromossomos anormais em células somáticas híbridas. Este enfoque depende da detecção de diferenças de dosagem dos produtos gênicos ou das próprias seqüências gênicas entre as células do paciente que contêm números diferentes de cópias de um determinado gene. A estratégia da dosagem gênica foi inicialmente usada para localizar genes do cromossomo 21 pela detecção dos níveis da atividade enzimática em linhagens celulares de pacientes com síndrome de Down (que têm três cópias — ou doses — do cromossomo 21), que eram 1,5 vez maiores que os níveis em linhagens celulares de genitores cromossomicamente normais (duas doses). No nível do DNA, o enfoque da dosagem tem sido crescentemente usado para situar marcadores de DNA no cromossomo X (pela comparação da dosagem de DNA de pessoas com um [isto é, cariótipo masculino normal] até cinco [isto é, um cariótipo 49,XXXXX] cromossomos X) (Fig. 8.6) ou regiões muito pequenas de um determinado cromossomo (examinando-se grupos de pacientes com trissomias parciais [três cópias] ou monossomias [uma cópia]; ver Caps. 9 e 10).

Uma das aplicações mais diretas do mapeamento por dosagem gênica é a localização de genes de doenças ligadas ao X em regiões específicas do cromossomo X examinando-se homens com deleções citogeneticamente detectáveis de parte do cromossomo X. Em um exemplo bem-estudado, um menino sem história familiar de nenhuma doença genética possuía quatro condições distintas ligadas ao X: distrofia muscular Duchenne (DMD), doença granulomatosa crônica (CGD), retinite pigmentosa (RP) e um raro tipo de fenótipo de hemácia. Uma cuidadosa análise citogenética revelou uma pequena mas detectável deleção na banda Xp21 (Fig. 8.7). A coexistência de quatro distúrbios monogênicos com a pequena deleção levou à conclusão de que os genes para estas quatro características ligadas ao X estavam mapeados no intervalo deletado. A correlação deste tipo de análise com outros indivíduos simultaneamente afetados por múltiplas doenças ligadas ao X permitiu a localização regional de vários genes nesta região do cromossomo X (ver Fig. 8.7). O paciente com a deleção Xp21 foi ainda mais significativo para a genética médica, pois (como descrito em mais detalhes adiante neste capítulo) seu cromossomo X deletado foi usado para identificar e isolar os genes para DMD e CGD. Este paciente forneceu ainda um outro exemplo de como o reconhecimento do incomum em medicina — neste caso, a ocorrência de múltiplas doenças genéticas em uma só pessoa — pode dar novas informações importantes sobre genes normais, sua organização e sua função.

Mapeamento Gênico por Hibridização *In Situ* com Fluorescência

Os métodos de mapeamento já discutidos são indiretos, pois fornecem informações sobre a localização física de um gene em um determinado cromossomo, mas, na verdade, não permitem mapear a posição do gene a ser visualizado. A visualização direta pode ser obtida usando-se o método de **hibridização *in situ***, que envolve a hibridização de sondas marcadas de DNA (ou RNA) diretamente com cromossomos metafásicos (ver Cap. 4). O DNA dos cromossomos metafásicos é desnaturado no local (daí, *in situ*)

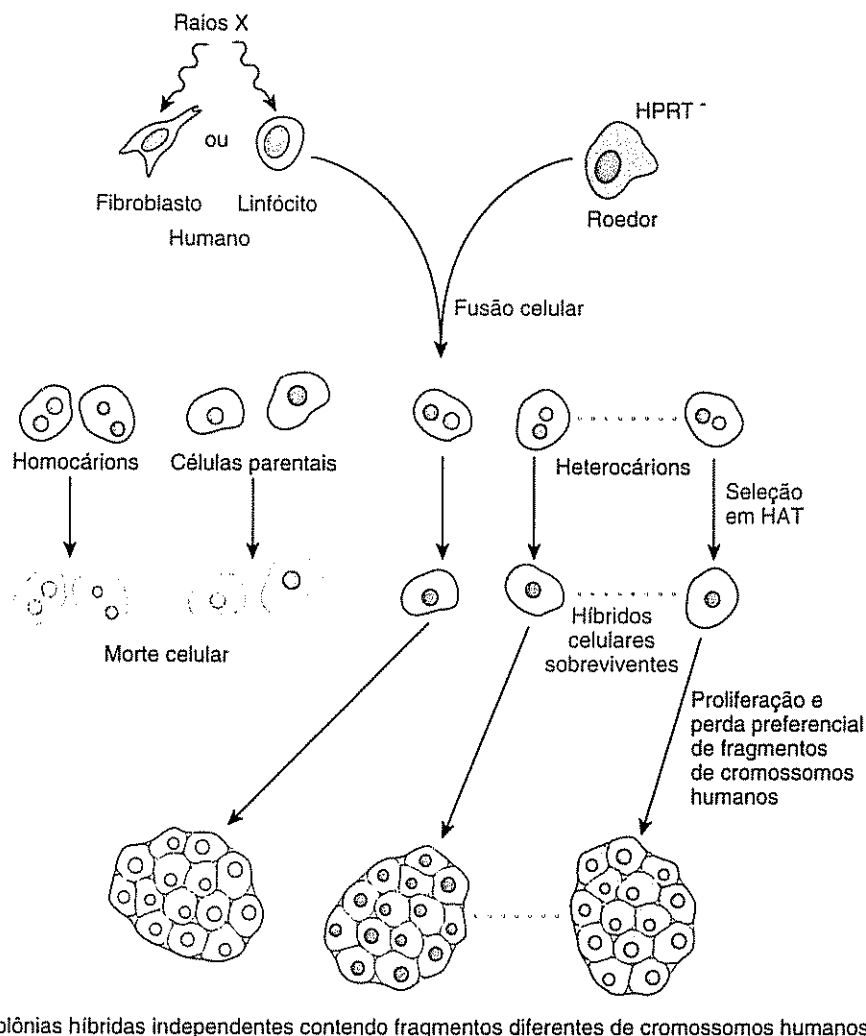



Fig. 8.5 Mapeamento com híbridos de radiação As células humanas são letalmente irradiadas para fragmentar os cromossomos e então hibridizadas a células somáticas de roedor. Os híbridos contendo um fragmento humano portador de um marcador bioquímico selecionável, tal como hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT), sobrevivem no meio seletivo Cada célula híbrida contém um conjunto aleatório de fragmentos cromossômicos (exceto pelo fragmento portador do marcador bioquímico usado para selecionar os híbridos interespecíficos)

na lâmina, para permitir a hibridização com uma sonda marcada. O local do sinal de hibridização — e, portanto, a localização do gene ao qual a sonda se hibridizou — é então determinado ao microscópio.

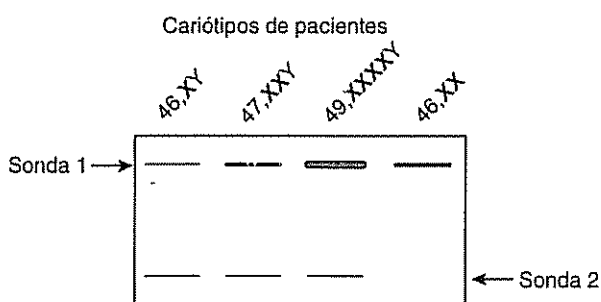



Fig. 8.6 Exemplos de mapeamento por análise de dosagem A sonda 1 de DNA usada à esquerda pode ser mapeada no cromossomo X porque a intensidade de hibridização parece ser uma função do número de X presentes em cada amostra de DNA A sonda 2 de DNA mostra a mesma intensidade de hibridização nas colunas de 1 a 3, mas está ausente na coluna 4 Este locus está no cromossomo Y

Os métodos para mapeamento de seqüências gênicas de cópia única por hibridização *in situ* foram desenvolvidos de modo a possibilitar a detecção rápida de sondas marcadas hibridizadas não-radioativamente com compostos que podem ser vistos por microscopia de fluorescência (Fig. 8.8). Mesmo em uma única metáfase, podemos facilmente ver a posição do gene a ser mapeado. Em combinação com os métodos de bandeamento para identificação de cromossomos (ver Caps. 2 e 9), a **hibridização *in situ* com fluorescência** (FISH) é usada para mapear genes em uma região de 1 a 2 milhões de pares de bases na cromatina altamente condensada de um cromossomo metafásico ou pró-metafásico.

Um mapeamento de resolução maior foi obtido pelo mapeamento FISH de fragmentos de DNA usando fibras de cromatina interfásica (*fiber*-FISH), que estão bem menos condensadas que os cromossomos metafásicos. Marcadores tão próximos quanto algumas centenas de kb distantes foram resolvidos quando marcados com corantes de cores diferentes, o que permitiu a determinação de sua ordem relativa entre si. A técnica *fiber*-FISH tem sido muito útil nas pesquisas destinadas à identificação de genes de doenças humanas, pois fornece aos pesquisadores informações detalhadas sobre a

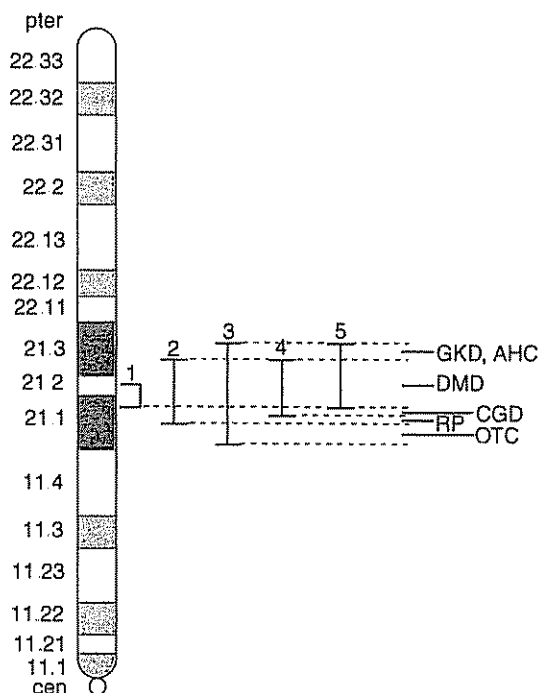



Fig. 8.7 Localização regional de genes ligados ao X em pacientes com deleções do cromossomo X. A correlação entre a extensão da deleção citogenética com um determinado distúrbio presente em cada caso permite o mapeamento fino dos genes individuais de doença com regiões particulares do cromossomo X. DMD = distrofia muscular Duchenne; OTC = deficiência de ornitina transcarbamilase. CGD = doença granulomatosa crônica. RP = retinite pigmentosa. GKD = deficiência de glicerol cinase. AHC = hiperplasia adrenal congênita. (Cortesia de U. Francke. Stanford University.)

ordem e a distância entre genes individuais na vizinhança de um gene de doença.

MAPEAMENTO DE GENES HUMANOS POR ANÁLISE DE LIGAÇÃO

A **ligação** pode ser definida como a tendência que os alelos próximos no mesmo cromossomo têm de ser transmitidos juntos, como uma unidade intata, pela meiose. A **análise genética de ligação** é um método de mapeamento de genes que usa estudos familiares para determinar se dois genes apresentam ligação (estão **ligados**) quando são transmitidos de uma geração para a seguinte. O mapeamento por análise genética de ligação difere do mapeamento pelos métodos físicos porque um mapeamento físico baseia-se em ter um método laboratorial para localizar um gene por FISH ou por hibridização de células somáticas. Em contraste, a análise de ligação é um enfoque imensamente importante e poderoso em genética médica porque *é o único método que permite o mapeamento de genes, incluindo os genes de doença, que são detectáveis apenas como características fenotípicas.* A grande maioria dos genes subjacentes a doenças genéticas está nesta categoria, pois nem as bases bioquímicas nem as bases moleculares foram elucidadas.

Ligação, Sintenia e Recombinação

Recombinação Homóloga na Meiose

Para compreender totalmente os conceitos subjacentes à análise de ligação genética é necessário rever de modo resumido o comportamento dos cromossomos e dos genes durante a meiose. Os cromossomos homólogos formam pares durante a meiose I, e os

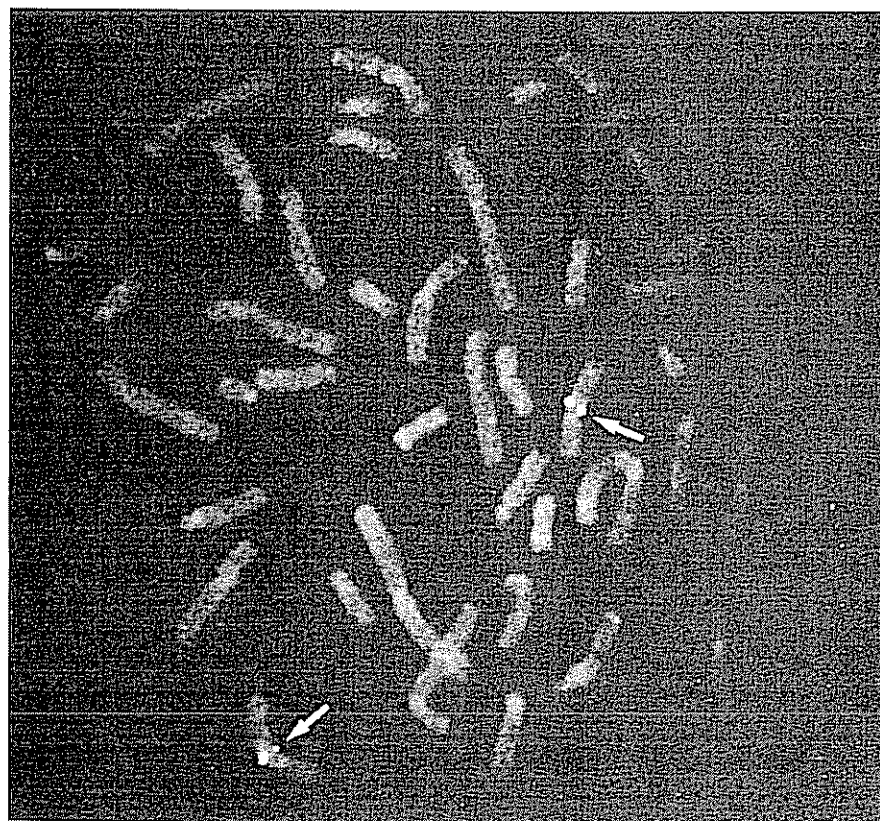



Fig. 8.8 Mapeamento gênico por hibridização *in situ* de uma sonda de DNA marcada com biotina para o gene de glicogênio fosforilase (*MGP*) em cromossomos metafásicos humanos. A localização do gene *MGP* é indicada pelos pontos brilhantes vistos em cada cromátide no sítio do gene na banda q13 do cromossomo 11. O mapeamento de *MGP* em 11q13 também situa o locus para a doença de McArdle, uma mioglobinúria autossômica recessiva causada pela deficiência de *MGP*. (Foto por cortesia de Peter Lichter. Yale University.)

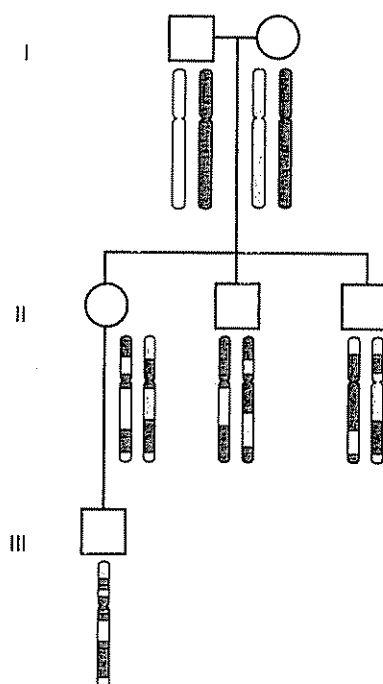
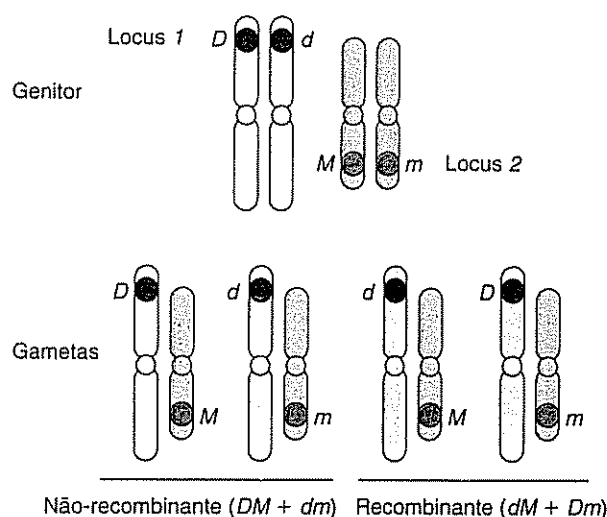



Fig. 8.9 O efeito da recombinação na origem de várias partes de um cromossomo. Devido ao crossing meiótico, a cópia de um cromossomo herdada pelo menino na geração III é na verdade um mosaico de partes de todas as quatro cópias dos avós deste cromossomo

Fig. 8.10 Comportamento meiótico de alelos em dois loci, *1* e *2*, quando estão situados em cromossomos separados

pares alinham-se no fuso meiótico. Os homólogos paternos e maternos trocam segmentos homólogos por crossing over e criam novos cromossomos que são um "mosaico", consistindo em partes alternadas dos cromossomos da avó e do avô (Fig. 8.9). A criação de tal "mosaico" cromossômico enfatiza a noção da individualidade genética humana: *cada cromossomo herdado por uma criança de um genitor nunca é essencialmente igual a uma das duas cópias deste cromossomo no genitor, mas contém alguns segmentos derivados do avô da criança e outros segmentos da avó da criança.*

Se os cromossomos homólogos em geral parecem idênticos ao microscópio, devemos ter um meio de diferenciar os homólogos. Só deste modo podemos deduzir a origem dos avós de cada segmento de um cromossomo herdado por uma determinada criança e assim determinar se e onde ocorreram os eventos de recombinação ao longo dos cromossomos homólogos. Para este fim, usamos os **marcadores genéticos**, que são definidos como qualquer característica situada no mesmo lugar em um par de cromossomos homólogos que nos permite distinguir um homólogo do outro. No passado, os genes que codificavam variantes eletroforéticas ou antígenos de superfície celular serviram como marcadores. Entretanto, na era do Projeto do Genoma Humano, os marcadores genéticos são mais comumente polimorfismos de seqüência de DNA que podem ser detectados por amplificação por PCR do segmento de DNA contendo o marcador (ver Cap. 6).

Como os marcadores genéticos são usados para o mapeamento de ligação genética? Suponha que existam dois loci marcadores genéticos, *1* e *2*, com os alelos *D* e *M* no cromossomo de origem paterna e os alelos *d* e *m* no cromossomo de origem materna em uma pessoa (Fig. 8.10). Se os dois loci estiverem situados em cromossomos diferentes, eles se distribuirão independentemente na meiose. Assim, observamos quatro tipos de prole (quatro tipos de gametas) *em proporções iguais*: *DM* e *dm*, que são chamados de **não-recombinantes** porque são idênticos aos cromossomos parentais originais, e os genótipos *Dm* e *dM*, que são chamados de **recombinantes** porque representam uma nova combinação de alelos que difere daquela dos cromossomos parentais. Quando são vistos números iguais de genótipos recombinantes e não-recombinantes (tal como quando dois loci não estão situados no mesmo cromossomo), os loci são ditos **não-ligados**.

Loci no Mesmo Cromossomo não Estão Necessariamente Ligados

Suponha, entretanto, que os loci *1* e *2* estão no mesmo cromossomo. Os genes que residem no mesmo cromossomo são ditos **sintênicos** (literalmente, "no mesmo filamento"), independente do quão próximos ou distantes eles estejam neste cromossomo. Sabemos que o crossing over ocorre no estágio de quatro filamentos da meiose, quando existem quatro cromátides por par de cromossomos. Se não ocorrer crossing entre os loci, apenas os genótipos não-recombinantes *DM* e *dm* serão vistos na prole. Se um ou mais crossings ocorrerem entre eles, entretanto, a proporção de genótipos não-recombinantes para recombinantes se tornará 1:1. De fato, uma média de 1 a 3 eventos recombinantes ocorrem em algum lugar ao longo de cada cromossomo por meiose. Como mostra a Fig. 8.11, uma, duas ou mais recombinações que ocorrem entre dois loci resultam em uma prole que é 50% recombinante e 50% não-recombinante. Assim, se dois loci sintênicos estiverem muito distantes no mesmo cromossomo, de modo a que exista pelo menos um crossing entre eles a cada meiose, os genótipos recombinantes e não-recombinantes ocorrerão na prole em proporções iguais, e os dois loci parecerão não-ligados, como se os loci estivessem em cromossomos separados.

A **análise de ligação genética** tira proveito destas propriedades da meiose usando a freqüência de recombinação para medir o quão próximos uns dos outros estão os loci geneticamente diferentes. Como mostra a Fig. 8.12A, se pelo menos um crossing ocorrer no segmento do cromossomo entre os loci *1* e *2*, tanto os genótipos não-recombinantes *DM* e *dm* quanto os genótipos recombinantes *Dm* e *dM* serão vistos, em média, em

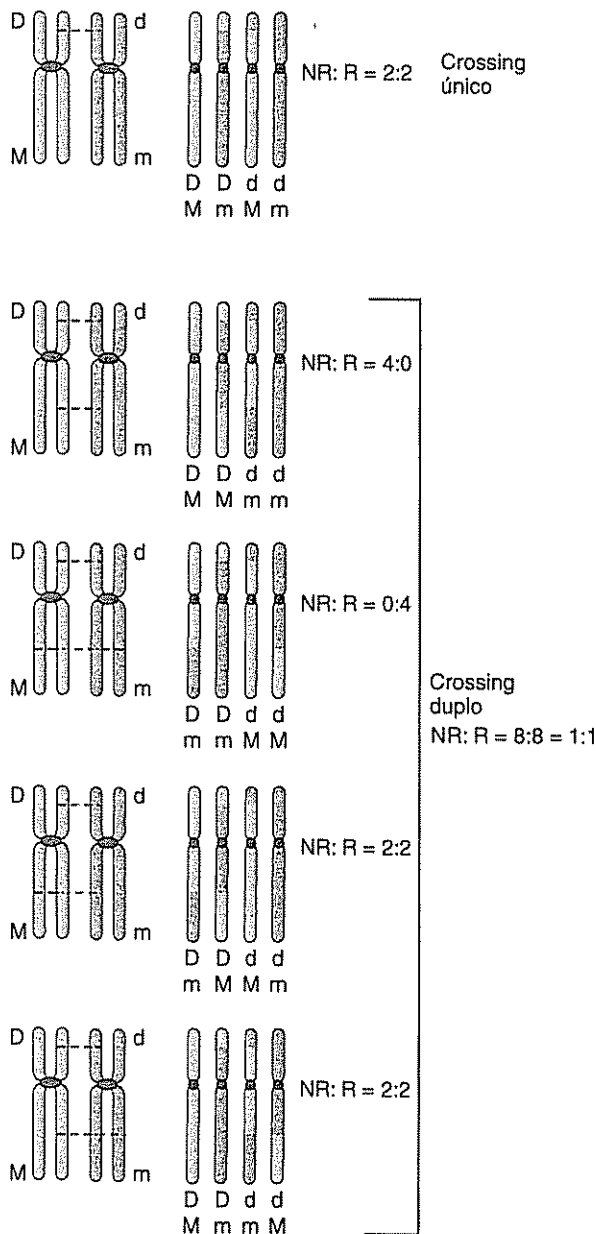



Fig. 8.11 Crossing entre cromossomos homólogos na meiose, resultando em uma nova combinação de alelos de origem materna e paterna nos cromossomos recombinantes. Se não ocorrer crossing no intervalo entre os loci *1* e *2*, apenas os genótipos parentais (não-recombinantes) *DM* e *dm* ocorrerão na prole. Se ocorrer um ou dois crossings no segmento entre os loci, metade da prole conterá um genótipo não-recombinante e metade, o genótipo recombinante. O mesmo é verdade se > de 2 crossings ocorrerem entre os loci (não ilustrados aqui).

iguais proporções na prole. Por outro lado, se os dois loci estiverem tão próximos no mesmo cromossomo que o crossing nunca ocorra entre eles, haverá uma ligação completa: os genótipos não-recombinantes (cromossomos parentais *DM* e *dm* na Fig. 8.12B) serão transmitidos juntos sempre, apenas as combinações alélicas não-recombinantes *DM* e *dm* nestes dois loci ocorrerão, e a freqüência dos genótipos recombinantes *Dm* e *dM* será 0. Entre estes dois extremos está a situação na qual dois loci estão suficientemente distantes para que ocorra a recombinação entre eles em algumas meioses e não em outras (ver a Fig. 8.12C). Observaremos combinações não-recombinantes e recombinantes de alelos na prole, mas a freqüência de genótipos recombinantes nos dois loci cairá para entre 0% (totalmente ligados) e 50% (totalmente não-ligados): *quanto menor a freqüência de recombinação, mais próximos estão os dois loci*. Uma representação comum para a frequência de recombinação é a letra grega θ.

Detecção da Ligação e Medida da Distância Genética

A detecção dos eventos de recombinação que permitem uma avaliação da ligação entre dois loci requer que um genitor seja heterozigoto ("informativo") em ambos os loci. Se a mãe na família mostrada na Fig. 8.13 fosse homozigota nos loci marcadores, seria impossível determinar se tinha ocorrido recombinação. Os loci mais informativos para a análise de ligação, portanto, são aqueles altamente polimórficos, tais como os marcadores microssatélites analisados por PCR, e, portanto, são heterozigotos em uma grande proporção de indivíduos (ver Cap. 6).

Medida da Distância Genética

Com estes comentários introdutórios, podemos agora examinar como se mede a ligação entre dois loci. Suponha que alguém esteja interessado em avaliar a possível ligação entre dois loci em uma série de famílias. Entre a prole das meioses informativas (aquelas em que um genitor é heterozigoto em ambos os loci), 80% não são recombinantes e 20% são recombinantes. A freqüência de recombinação θ, portanto, é de 20%.

A distância genética é medida em unidades chamadas de **centiMorgan** (cM), definida como a distância genética na qual, em média, observa-se recombinação em 1% das vezes. (O cM é 1/100 de um Morgan, designado em homenagem a Thomas Hunt Morgan, que primeiro observou o crossing over, na mosca-das-frutas *Drosophila*.) Portanto, traduzindo uma fração de recombinação de 20% em distância genética, pode-se estimar que os dois distam cerca de 20 cM geneticamente. Esta estimativa, entretanto, só é válida se o tamanho da prole for suficiente para que se possa confiar o que a proporção observada de 80:20 de não-recombinantes para recombinantes é de fato diferente da proporção 50:50 esperada para loci que se distribuem independentemente, pois estão muito distantes no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes. De fato, se quatro dentre cinco crianças fossem não-recombinantes e uma recombinante, esta proporção não seria significativamente diferente do resultado esperado para loci totalmente não-ligados que se distribuem aleatoriamente (você consideraria significante se ao lançar uma moeda cinco vezes desse cara quatro vezes?). Caso observássemos a mesma proporção de 80:20 após avaliar várias dúzias de crianças de várias famílias, entretanto, certamente seria considerado diferente de 50:50, assim como você acharia incomum que ao lançar uma moeda 50 vezes desse cara 40 vezes.

Valores Lod: Dois Loci Estão Ligados?

Suponha que desejemos determinar se dois loci estão ligados. Para fazer isto, precisamos de duas informações. Primeiro, devemos determinar a fração de recombinação θ entre os dois loci, pois determinar se os dois loci estão ligados é equivalente a perguntar se a fração de recombinação entre eles difere significativamente da fração 0,5 que se espera para loci não-ligados. Se-

(DM + dm) = (Dm + dM)

só (DM + dm)

(DM + dm) >> (Dm + dM)

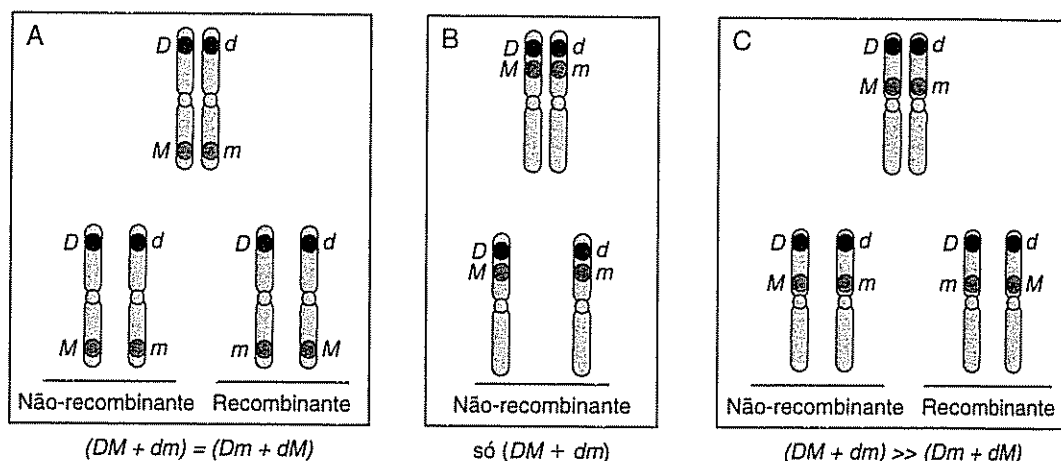



Fig. 8.12 Comportamento meiótico de alelos em dois loci, *1* e *2*, quando (A) eles estão situados bem distantes no mesmo cromossomo, (B) eles estão situados bem próximos no mesmo cromossomo e (C) quando estão situados no mesmo cromossomo, mas suficientemente distantes para que ocorra crossing meiótico

gundo, precisamos determinar se um desvio, se é que algum, de 0,5 é verdadeiramente significativo usando um instrumento estatístico, chamado de proporção das probabilidades, do seguinte modo: examinamos um conjunto de dados familiares reais, contamos o número de filhos que apresentam ou não recombinação entre os loci e, finalmente, calculamos a probabilidade de observar os dados em vários valores possíveis de θ, variando de θ = 0,0 (sem recombinação) a θ = 0,50 (distribuição aleatória). Tomamos as proporções destas duas probabilidades para calcular as chances de obter os dados observados supondo que os dois loci *estão* ligados em alguma fração θ de recombinação, em comparação com a situação na qual eles *não* estão ligados. As chances a favor de um determinado valor de θ são, portanto, =

$$\frac{\text{probabilidade dos dados se os loci estiverem ligados em um certo } \theta}{\text{probabilidades dos dados se os loci não estiverem ligados } (\theta = 0,50)}$$

As proporções computadas em geral são expressas como $\log_{10}$ desta proporção e chamadas de **valor lod** (*Z*) para "logaritmo das chances." (O uso de logaritmos permite que os dados coletados de famílias diferentes sejam combinados por simples adição.)

A proporção das chances é importante de dois modos. Primeiro, ela fornece um método estatístico válido para usar os dados familiares para estimar a freqüência de recombinação entre os loci: o valor de θ que dá o maior valor de Z é, de fato, a melhor estimativa da fração de recombinação que você pode fazer com os dados. Este valor de θ é chamado de θ_{max}. Se θ_{max} diferir de 50%, você terá evidência de ligação. Entretanto, mesmo que θ_{max} seja a melhor estimativa de θ que você pode ter, o quão boa ela é? A proporção das chances também lhe dá uma resposta para esta pergunta, pois *quanto maior o valor de Z, melhor a estimativa de* θ_{max}. Os valores positivos de Z (chances > 1) sugerem que os dois loci estão ligados, enquanto os valores negativos (chances < 1) sugerem que a ligação é menos provável (neste valor de θ) que a possibilidade de que os dois loci não estejam ligados. *Por convenção, um valor lod combinado de +3 ou maior (equivalente a maior que 1.000:1 chances a favor da ligação) é considerado uma evidência definitiva de que os dois loci estão ligados.*

A localização de genes por análise de ligação nos dá uma oportunidade de identificar genes medicamente relevantes que não são compreendidos em termos bioquímicos ou moleculares. Considere a família mostrada na Fig. 8.13. A mãe tem uma forma autossômica dominante de RP (RP9). Ela também é heterozigota para dois loci no cromossomo 7, um perto do gene *RP9* e outro não. Podemos ver que a transmissão do alelo mutante *RP9 (D)* invariavelmente "segue" a do alelo *B* no locus marcador *2* da primeira geração para a segunda geração nesta família. Todos os três filhos que herdaram o alelo mutante *RP9* da mãe também herdaram o alelo *B* no locus marcador *2*, enquanto toda a prole que herdou o alelo normal da mãe herdou o alelo

Fig. 8.13 Ligação do gene para uma forma autossômica dominante de retinite pigmentosa, RP9, em um locus marcador. A mãe (I-1) é afetada por esta doença dominante e é heterozigota no locus *RP9* (*Dd*), bem como em dois outros loci, *1* e *2*, no cromossomo 7. Ela leva os alelos *A* e *B* no mesmo cromossomo que o alelo mutante *RP9 (D)*. O pai não-afetado é homozigoto normal (*dd*) no locus *RP9*, bem como nos dois loci marcadores (*AA* e *BB*). Suas contribuições não são consideradas depois. Todos os três filhos afetados herdaram o alelo *B* no locus *2* de sua mãe, enquanto os três não-afetados herdaram o alelo *b*. Assim, todos os seis filhos são não-recombinantes para *RP9* e o locus marcador *2*. Entretanto, os indivíduos II-1, II-3 e II-5 são recombinantes para *RP9* e o locus marcador *1*, o que indica que o crossing meiótico ocorreu entre estes dois loci

b. O gene *RP9*, entretanto, não apresenta tendência de seguir o alelo no locus marcador *1*.

Suponha que θ seja a "verdadeira" fração de recombinação entre *RP9* e o locus *2*, a fração que veríamos se tivéssemos números ilimitados de prole para testar. Visto deste modo, θ pode ser considerado como sendo a probabilidade, a cada meiose, de que ocorra uma recombinação entre os dois loci. Como a recombinação ocorre ou não ocorre, a probabilidade de uma recombinação, θ, e a probabilidade de não haver recombinação devem somar 1. Portanto, a probabilidade de que não ocorra recombinação é $1 - \theta$.

De fato, existem apenas seis filhos, todos não apresentando recombinação. A probabilidade de ver 0 prole recombinante e 6 sem recombinação entre *RP9* e o locus marcador *2* é dada por $(\theta)^0(1 - \theta)^6$. O valor de lod entre *RP9* e o marcador *2* é portanto,

$$Z = \log_{10} \frac{(\theta)^0(1-\theta)^6}{(1/2)^0(1/2)^6}$$

O valor máximo de *Z* é 1,81 quando $\theta = 0$, o que sugere, mas não evidencia de forma definitiva, ligação, pois *Z* é positivo, mas menor que 3. Se resultados similares forem obtidos pelo estudo de outras famílias, os valores lod poderão ser somados para se atingir a significância ($Z > 3$). Neste caso, podemos dizer definitivamente que o gene *RP9* e o locus marcador *2* estão ligados, enquanto o gene *RP9* e o locus *1* não estão (muito embora ainda sejam sintênicos). Como a localização cromossômica do locus *2* já era conhecida como estando em 7p15 pelos métodos de mapeamento físico, a localização do locus *RP9* agora também é conhecida como estando próxima de 7p15.

Fig. 8.14 Fases de ligação possíveis dos alelos *1* e *2* em um locus marcador com os alelos *D* e *d* em um locus de doença.

Fase na Análise de Ligação

Ser heterozigoto para um marcador polimórfico ligado e o gene da doença (como na Fig. 8.13) não é, entretanto, suficiente para detectar ligação. Também precisamos conhecer quais dos alelos polimórficos estão situados no mesmo cromossomo que o alelo da doença, isto é, a **fase** deve ser conhecida. Diz-se que os alelos no mesmo homólogo estão **em acoplamento** (ou ***cis***), enquanto os alelos em homólogos diferentes estão **em repulsão** (ou ***trans***) (Fig. 8.14). Os alelos em acoplamento em um conjunto de marcadores proximamente ligados constituem o que é conhecido como **haplótipo** para estes loci. Para ilustrar o conceito de fase, consideramos dois exemplos que demonstram a importância de conhecer a informação da fase na análise de ligação. A Fig. 8.15 mostra heredogramas de duas famílias com neurofibromatose tipo 1 (NF1) autossômica dominante. Na família com duas gerações, a mãe afetada é heterozigota tanto no locus *NF1* (*D/d*) quanto no locus marcador (*1/2*), mas nós não sabemos se o alelo *NF1* está em acoplamento com o alelo *1* ou o alelo *2* no locus marcador. O pai nesta análise não é informativo, pois é homozigoto para o alelo normal *d* no locus *NF1* e para o alelo *1* no locus marcador. Ele transmite para sua prole um cromossomo que tem o alelo normal (*d*) e o alelo *1*, independente do quão distantes estejam os loci ou se ocorreu recombinação. Por inspeção, então, podemos deduzir quais alelos em cada filho vieram da mãe. Dois filhos herdaram os alelos *D* e *2* e um filho recebeu *d* e *1*. Dependendo da fase real destes alelos na mãe, ou todos os três filhos são recombinantes ou todos os três não são recombinantes (ver Fig. 8.15, *esquerda*).

Qual destas duas possibilidades é a correta? Não há modo de saber com certeza e, assim, devemos comparar as probabilidades dos dois resultados possíveis. Em metade das vezes, a fase correta é *D2* e *d1*, e todas as três crianças herdaram um cromossomo no qual *nenhuma recombinação* ocorreu entre *NF1* e o locus marcador. Se a probabilidade de recombinação entre *NF1* e o marcador é θ, a probabilidade de não haver recombinação é $(1 - \theta)$, e a probabilidade de três cromossomos não-recombinantes é $(1 - \theta)^3$. A probabilidade geral, então, supondo esta fase, é $1/2\,(1 - \theta)^3$. Na outra metade das vezes, entretanto, a fase cor-

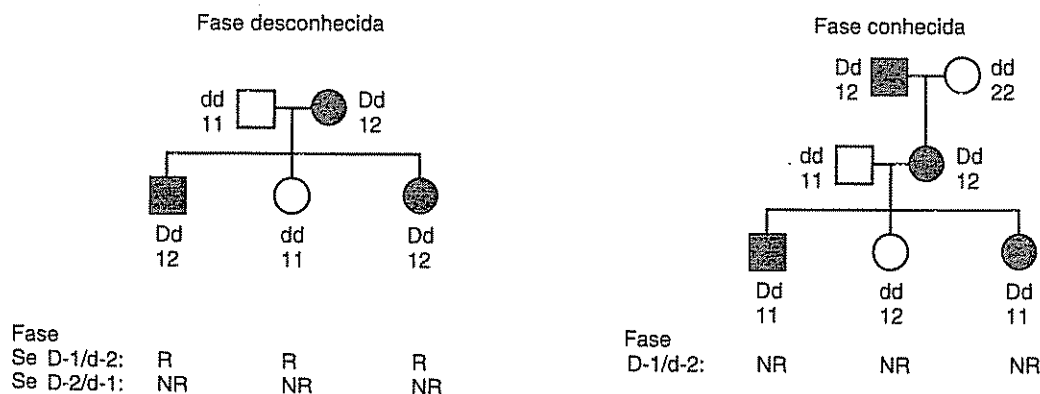



Fig. 8.15 Comparação da informação de ligação em heredogramas com fase desconhecida e fase conhecida. R = recombinantes. NR = não-recombinantes. Ver o texto para discussão.

QUADRO 8-2

Análise de Verossimilhança Máxima (*Maximum Likelihood*) para a Ligação entre NF1 e um Locus Marcador nos Heredogramas da Fig. 8.15

	Valores *Lod* (Z) em Vários Valores de θ								
Tipo de Heredograma	*0,00*	*0,01*	*0,05*	*0,10*	*0,20*	*0,30*	*0,40*	Z_{max}	θ_{max}
Fase desconhecida	0,602	0,589	0,533	0,465	0,318	0,170	0,049	0,602	0,00
Fase conhecida	0,903	0,890	0,837	0,765	0,612	0,438	0,237	0,903	0,00

reta é *D1* e *d2*, que torna cada uma destas três crianças *recombinantes*. A probabilidade, supondo esta fase alternativa, é $1/2\ \theta^3$. Para calcular a probabilidade geral do alelo *D* da doença NF1 estar em acoplamento com o alelo marcador 2 em todas as três crianças, somamos a probabilidade calculada supondo que uma fase na mãe está correta com a probabilidade calculada supondo que a outra fase está correta. Portanto, a probabilidade geral é = $1/2\ (1 - \theta)^3 + 1/2\ \theta^3$.

Por outro lado, se não há ligação entre estes loci, espera-se uma segregação independente dos dois loci, e as probabilidades de um genótipo recombinante e um não-recombinante na prole são iguais a 1/2. A probabilidade de ter três filhos com estes genótipos, sob a suposição de não-ligação, é de $(1/2)^3$, ou 1/8. Então, as chances relativas para este heredograma são

$$\frac{1/2(1 - \theta)^3 + 1/2\ \theta^3}{1/8}$$

Avaliando as chances relativas para valores de θ de 0 a 0,5, o valor máximo do valor lod, Z_{max}, é de $\log_{10}(4) = 0{,}602$ quando $\theta = 0{,}0$ (Quadro 8.2). Como isto está distante de um valor lod maior que 3, precisaríamos de pelo menos cinco famílias equivalentes para estabelecer a ligação (em $\theta = 0{,}0$) entre este locus marcador e *NF1*. Com cálculos um pouco mais complexos (feitos mais facilmente por programas computadorizados escritos para facilitar a análise de ligação), podemos calcular os valores lod de outros valores de θ (ver Quadro 8.2).

Conhecimento da Fase e Heredogramas Desconhecidos. A segunda família na Fig. 8.15 é similar, exceto pelo fato de os genitores da mãe estarem disponíveis para análise. Por inspeção, fica claro que o avô materno deve ter transmitido tanto o alelo (*D*) de *NF1* quanto o alelo *1* para sua filha. (Este achado não requer nenhuma suposição sobre se ocorreu ou não um crossing na linhagem germinativa do avô. Tal suposição não estaria garantida.) A fase na mãe deve, portanto, ser *D1* em um cromossomo e *d2* no outro. A disponibilidade de uma terceira geração torna este **heredograma com fase conhecida**. As três crianças podem agora ser definitivamente dadas como não-recombinantes. Comparar as possibilidades de ligação e não-ligação agora é mais simples, pois não temos que considerar a fase oposta. A probabilidade de ter três crianças com os genótipos observados é conhecida $(1 - \theta)^3$. Como no heredograma anterior com fase desconhecida, a probabilidade dos dados observados, se não houver ligação entre os loci, é de $(1/2)^3 = 1/8$. As chances relativas deste heredograma são $(1 - \theta)^3{:}1/8$ a favor da ligação e o valor lod máximo *Z* em $\theta = 0{,}0$ é 0,903 (ver Quadro 8.2). Assim, a força da evidência que apóia a ligação é duas vezes maior na situação de fase conhecida que na situação de fase desconhecida.

Determinação da Fase em Heredogramas Ligados ao X. Para a análise de ligação em heredogramas ligados ao X, o genótipo do pai da mãe é particularmente importante, pois, como ilustrado na Fig. 8.16, ele nos dá uma informação direta da fase de ligação na mãe. Como não pode haver recombinação entre os genes ligados ao X em um homem porque a mãe sempre recebe apenas o único X do pai, qualquer marcador ligado ao X presente em seu genótipo, mas não em seu pai, deve ter sido herdado da mãe. O conhecimento da fase, tão importante na consulta genética, pode assim ser prontamente avaliado pelos membros masculinos apropriados de um heredograma ligado ao X, se eles estiverem disponíveis para estudo.

Equilíbrio de Ligação

As duas famílias da Fig. 8.15 ilustram um outro conceito muito importante. Em uma família, o alelo mutante *NF1* estava associado ao alelo *1* no locus marcador proximamente ligado. Na outra família, *NF1* estava associado ao alelo *2*. Em geral, não há associação entre os alelos da doença e determinados alelos em um locus polimórfico ligado. A fase de ligação tem que ser estabelecida para cada família independentemente das outras famílias não-relacionadas. As freqüências alélicas nos dois loci são ditas estando em **equilíbrio de ligação**. As proporções relativas das combinações alélicas possíveis podem ser previstas pelo produto das freqüências populacionais dos alelos em loci individuais. Assim, se uma doença estiver ligada a um marcador polimórfico com dois alelos de igual freqüência, o alelo da doença estará em acoplamento com um dos alelos marcadores em metade das famílias afetadas e com o outro alelo na outra meta-

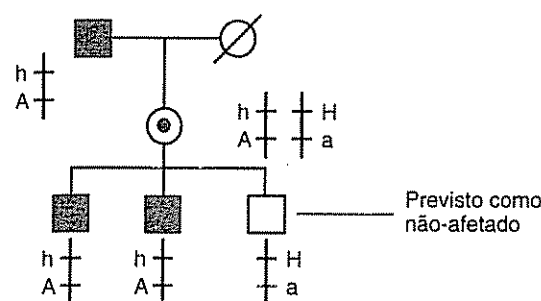



Fig. 8.16 Na ligação ao X, o fenótipo do avô materno pode revelar a fase de ligação em sua filha. Neste heredograma, o cromossomo X do avô materno afetado leva o alelo *A* em um locus marcador proximamente ligado ao gene para hemofilia A (*h*). Assim, sua filha tem estes alelos em um de seus cromossomos X e os alelos *a* e *H* no outro, muito embora não exista informação direta sobre o genótipo da mãe. O conhecimento da fase do genótipo pode ser usado para prever os genótipos de sua prole masculina, incluindo um feto masculino diagnosticado na fase pré-natal.

de das famílias. Compare esta situação com uma na qual uma mutação que produza doença seja vista em acoplamento apenas com um determinado alelo em um locus ligado ao gene da doença. Esta situação, chamada de **desequilíbrio de ligação**, é rara, mas é extremamente valiosa para a análise genética, como ilustrado mais adiante neste capítulo com relação ao gene da fibrose cística (CF).

Mapas de Ligação Genética

Mapas de ligação de um grande número de loci, mesmo de cromossomos inteiros, foram criados combinando-se medidas de distâncias genéticas entre loci proximamente ligados obtidos dois de cada vez. Suponha que dois loci, *A* e *B*, estejam ligados distando cerca de 10 cM. Com esta informação, podemos agora construir um mapa genético para o cromossomo no qual os loci *A* e *B* estão situados. Loci adicionais poderão ser acrescentados ao mapa de ligação se suas distâncias dos loci *A* e *B* puderem ser medidas. Por exemplo, considere um terceiro locus *C*, que achamos estar ligado a *A* com um valor lod máximo em $\theta = 0,12$ e ligado a *B* com um valor lod máximo em $\theta = 0,05$. Com apenas estes dados de dois pontos, a ordem dos três loci em relação uns aos outros pode ser estabelecida por inspeção: a ordem provável será *A-B-C*, com o seguinte mapa.

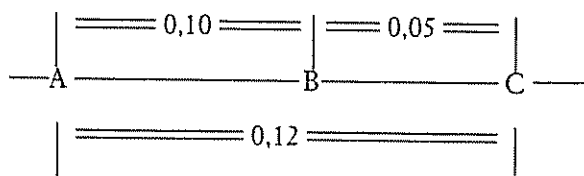
0,10 — 0,05
A — B — C
0,12

Note que a distância *A–C* medida pela freqüência de recombinação é menor que a soma das distâncias *A–B* e *B–C*. Esta discrepância deve-se ao fato de que os crossings duplos (um no intervalo *A–B* e um no intervalo *B–C*) não resultam em recombinação entre *A* e *C* e, portanto, leva a uma subestimação das distâncias entre eles.

Fig. 8.17 Determinação da ordem de marcadores usando-se cruzamentos multiponto. Os indivíduos III-1 e III-2 receberam gametas de seu pai, II-1, nos quais devem ter ocorrido crossings. Existem três ordens possíveis, com os loci *A*, *B* ou *C* situados entre os outros dois. Crossings duplos serão necessários para explicar os genótipos de III-1 e III-2 se *A* ou *C* estiver entre os outros dois loci. Apenas a ordem que coloca *B* entre *A* e *C* explicaria os genótipos dos indivíduos III-1 e III-2 por eventos de crossing único. Outras ordens são menos prováveis.

Análise de Ligação Multiponto

Um método alternativo para determinar a ordem entre três loci é considerar todos os dados juntos, um processo chamado de **análise multiponto**, em vez dos cruzamentos separados de dois pontos. O princípio da análise multiponto é estabelecer a ordem de marcadores diminuindo o número de crossings aparentemente múltiplos (Fig. 8.17). Nos estudos de mapeamento muito complexos em particular, aqueles que envolvem dúzias de loci marcadores, a análise multiponto pode dar um forte suporte estatístico de que uma determinada ordem de marcadores está correta. Os mapas criados pela análise multiponto podem então ser usados como estrutura para fornecer a informação diagnóstica a ser usada na consulta genética (Fig. 8.18).

Com o aumento da atenção enfocada no mapeamento gênico como parte do Projeto do Genoma Humano (ver discussão mais adiante), detalhados mapas genéticos de ligação de todo o genoma humano foram construídos usando uma bateria de grandes famílias de três gerações para medir o mais precisa e refinadamente possível a freqüência de recombinação entre milhares de marcadores microssatélites de DNA informativos (ver, por exemplo, os bancos de dados de mapas de ligação humanos gerados pelo Cooperative Human Linkage Center). Não há mais nenhum "território geneticamente não-mapeado", e novos genes, incluindo muitos de significado médico, estão sendo semanalmente adicionados ao mapa genético humano.

Relação entre Distância Genética e Física

O tamanho genético total dos 23 cromossomos em todo o genoma humano haplóide foi inicialmente estimado como sendo de cerca de 3.000 cM, com base no número observado de quiasmas vistos na meiose 1 na espermatogênese (ver Cap. 2). Uma medida recente e mais apurada de cerca de 4.300 cM foi gerada somando-se todas as distâncias entre os milhares de marcadores genéticos que foram situados no mapa genético humano pelo Cooperative Human Linkage Center. Se o genoma, com um tamanho físico haplóide de aproximadamente 3×10^9 pares de bases, mede cerca de 4.300 cM em distância genética, 1 cM equivale a aproximadamente 700.000 pares de bases. O Quadro 8.3 resume as relações entre os marcos citogenéticos, as distâncias físicas e as distâncias genéticas e as

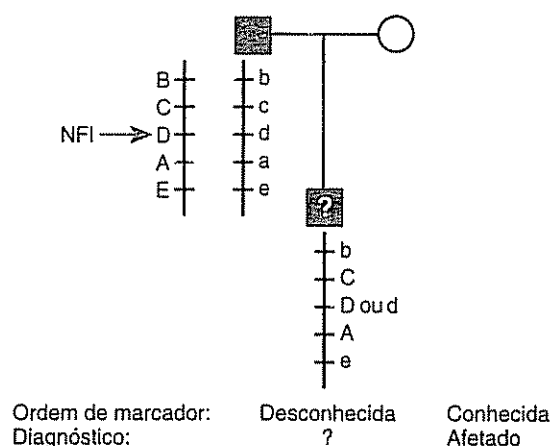



Fig. 8.18 Mapa normal de ligação genética no cromossomo 17 e sua aplicação na consulta genética para *NF1* Conhecer a ordem de marcadores no cromossomo 17 nos permite interpretar os dados de ligação na família e o diagnóstico no feto masculino, que se prevê que seja afetado Sem o mapa normal para comparação, a família não teria sido informativa, pois a posição do crossing observado com relação ao locus *NF1* teria sido desconhecida Assim, nenhum diagnóstico teria sido possível

correlaciona com o conteúdo gênico aproximado. A freqüência de recombinação, entretanto, não é constante ao longo de um cromossomo ou pelo genoma. Além disso, a freqüência de recombinação entre dois loci também nem sempre é idêntica na meiose masculina e feminina. Como conseqüência, a distância genética (medida como a porcentagem de recombinação na meiose) e a distância física (medida em pares de bases ou bandas cromossômicas) só podem ser comparadas como uma ligeira aproximação e fornecem medidas muito diferentes, embora correlatas, da distância entre os genes.

APLICAÇÃO DO MAPEAMENTO GÊNICO HUMANO

A principal aplicação do mapeamento gênico à genética médica é a localização e a identificação dos genes de doenças. Os marcadores ligados a genes de doenças podem então servir como marcos para os mapas físicos usados para clonar genes responsáveis por uma doença genética. O mapeamento genético é ajudado pelo conhecimento da posição no mapa físico dos marcadores polimórficos usados na análise de ligação. Os esforços do mapeamento físico para refinar a localização de um gene podem ser orientados pela existência de crossings meióticos específicos, detectados como parte da análise de ligação, os quais podem definir os limites dentro dos quais o gene da doença deve estar. *Os mapas genéticos e os mapas físicos são interdependentes e complementares.*

Mapeamento de Genes de Doença por Análise de Ligação

A Importância dos Estudos de Famílias

O mapeamento de genes de doenças começa com a identificação e o registro de um número suficiente de famílias para estabelecer a ligação. Achar famílias adequadas, entretanto, pode ser um desafio, em particular para distúrbios raros ou distúrbios nos quais as pessoas afetadas morrem ainda jovens (e amostras de DNA não estão disponíveis para análise). Os membos familiares são cuidadosamente examinados para determinar quem é e quem não é afetado pela doença. O DNA é obtido de todos os membros familiares relevantes disponíveis. Qualquer célula nucleada pode servir como fonte de DNA: os leucócitos de sangue periférico são as usadas com mais freqüência, mas as células da mucosa bucal da parte interna da bochecha, células cutivadas e mesmo tecidos de amostras fixadas embebidas em parafina podem fornecer DNA para análise. Uma vez conhecida a condição de doença de todos os membros da família, suas amostras de DNA são usadas para descobrir seus genótipos em um conjunto de marcadores polimórficos pelo genoma. O gene responsável pelo fenótipo da doença pode então ser analisado quanto à ligação a cada um dos marcadores polimórficos.

Dois tipos de famílias têm sido usados para mapear genes de doenças (Fig. 8.19). Em um, é avaliado um pequeno número de famílias muito grandes. A desvantagem deste enfoque é que todos os membros afetados do heredograma são conhecidos como tendo a mesma doença genética, causada por uma mutação no mesmo gene. O enfoque alternativo é coletar um grande número de famílias um pouco menores. Esta estratégia é mais fácil para doenças relativamente comuns, tais como a CF (ver Fig. 8.19), mas tem o risco de que nem todas as famílias tenham o distúrbio geneticamente idêntico. A **heterogeneidade de locus** é causada por defeitos em dois ou mais loci genéticos. A presença de heterogeneidade de locus desconhecida pode confundir a análise genética de ligação, pois pode dar a impressão de que um marcador não está ligado a um locus de doença quando de fato ele pode estar ligado, mas apenas em parte das famílias analisadas. Esta situação é ilustrada mais adiante no caso da ligação em RP autossômica dominante.

O Limite de 10 CentiMorgan

Na prática da genética humana, podemos esperar encontrar ligação apenas em uma distância de cerca de 10 cM ou menos, pois com distâncias maiores em geral não podemos encontrar material familiar suficiente para estabelecer evidência significativa de ligação (um valor lod > 3). Em outras palavras, um marcador polimórfico geralmente tem que estar mais ou menos dentro de 7,5 milhões de pares de bases distante do gene da doença de interesse para que a ligação possa ser detectada. Para uma característica autossômica, 7,5 milhões de pares de bases é aproxima-

QUADRO 8–3

Comparação de Parâmetros Citogenéticos, Físicos e Genéticos no Genoma

Citogenética	Tamanho Físico	Distância Genética	Conteúdo Gênico
Genoma haplóide de 23 cromossomos	3×10^9 pares de bases	4 300 cM	± 50.000 genes
Um cromossomo médio	$1{,}5 \times 10^8$ pares de bases	± 200 cM	± 2.200 genes
1 banda cromossômica	3×10^6 pares de bases	± 5 cM	± 50 genes

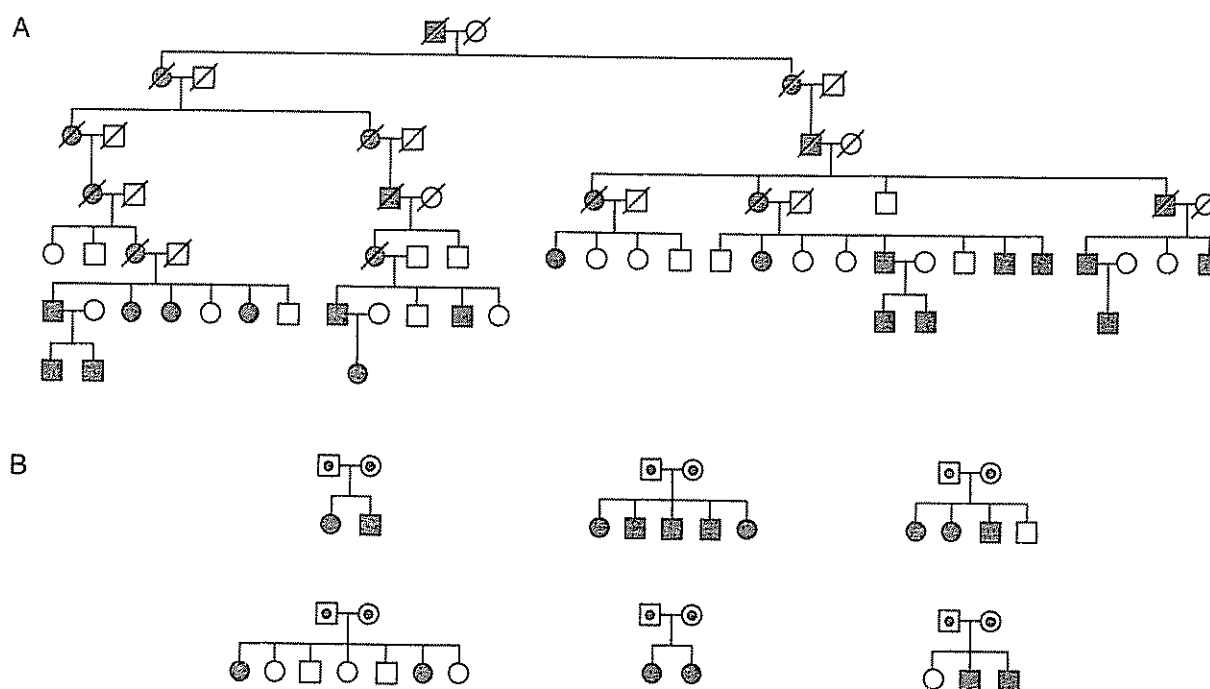



Fig. 8.19 Dois enfoques de coleta de famílias para análise de ligação. A ligação bem-sucedida da doença de Huntington a um marcador polimórfico no cromossomo 4 baseia-se em grande parte em um único heredograma grande da Venezuela, do qual uma pequena parte é mostrada em A. A ligação bem-sucedida da fibrose cística a um marcador polimórfico no cromossomo 7, entretanto, baseia-se em uma coleção de muitas famílias menores, algumas das quais são mostradas em B. (Adaptada de Gusella J F, Wexler N S, Conneally P M, *et al* [1983] A polimorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature 306:224-238, e Tsui L-C, Zengerling A, Willard H F, Buchwald M [1986] Mapping of the cystic fibrosis locus on chromosome 7. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 51:325-335.)

damente 1/400 do genoma e, portanto, poderíamos prever que, em média, 400 ou mais marcadores polimórficos bem espaçados serviriam como um conjunto adequado de marcadores para testar a ligação na coleção familiar. Deve ficar claro que a situação é consideravelmente mais fácil para doenças ligadas ao X, pois já conhecemos a localização cromossômica do gene. Em conseqüência, uma doença ligada ao X pode ser mapeada em uma região específica do cromossomo X usando apenas de 15 a 20 marcadores ligados ao X.

Confirmação da Ligação e Definição do Menor Intervalo de Ligação

Quando se começa uma pesquisa sobre ligação, a expectativa em relação a um determinado marcador polimórfico é que, por acaso, ele *não esteja* ligado ao gene da doença (de fato, por acaso, é improvável que qualquer marcador esteja no mesmo cromossomo do gene da doença). Portanto, são necessárias apenas algumas meioses informativas para estabelecer que o marcador não está perto do gene de interesse. Quando um marcador apresenta evidências sugestivas de ligação (um valor lod máximo combinado entre 2 e 3, por exemplo), a integração dos mapas físicos e genéticos já amplos de cada cromossomo humano torna-se extremamente valiosa. Outros marcadores conhecidos como estando na mesma região que o marcador ligado podem ser imediatamente testados para determinar se a ligação pode ser confirmada. Se, por exemplo, o marcador estiver mapeado em uma posição no braço longo do cromossomo 7, podemos enfocar a atenção em outros marcadores polimórficos nesta região para confirmar ou rejeitar o resultado de ligação sugerido. Depois que encontramos um ou mais marcadores dentro de cerca de 5 cM do gene da doença, podemos usá-los para rastrear os genes da doença em famílias para fins diagnósticos. Eles também podem servir como pontos de partida para refinados estudos de mapeamento direcionados para identificar e isolar o próprio gene da doença.

Uma vez confirmado o resultado da ligação suspeita, testamos outros marcadores que estão mapeados perto dos marcadores ligados conhecidos para encontrar outros marcadores que estejam ligados tão proximamente que não apresentem recombinação com o gene da doença ($\theta_{max} = 0$). Neste estágio, também é extremamente importante identificar os marcadores mais próximos em ambos os lados do gene da doença que *se recombinam* pelo menos uma vez com o gene da doença nas famílias que estão sendo estudadas. Os marcadores que apresentam pelo menos um evento de recombinação definem os limites do intervalo no qual pode estar o gene da doença.

Mapeamento de Alta Resolução

Técnicas tais como a hibridização de células somáticas, híbridos de radiação e FISH em cromossomos metafásicos podem localizar genes em regiões que variam de tamanho desde um cromossomo inteiro até um segmento de um cromossomo de aproximadamente 350.000 pares de bases, ou cerca de 0,1% a 0,7% do tamanho linear de um cromossomo típico. A resolução do mapeamento de ligação genética é ainda mais limitado por dois motivos. Primeiro, o valor de θ sempre tem a imprecisão inerente a uma estimativa estatística e depende de que material da família está disponível para o estudo. Segundo, após eventualmente identificar um conjunto de marcadores em uma região, todos os quais não apresentam recombinação com o gene da doença, não é possível um maior aumento de resolução: o gene da doença pode estar em qualquer ponto entre os marcadores que não se

recombinam nas famílias Reduzir ainda mais o intervalo de ligação requer famílias adicionais, na esperança de encontrar recombinações adicionais no que já é uma região limitada, para permitir um maior estreitamento do intervalo ao redor do gene da doença (embora uma resolução maior seja possível se o desequilíbrio de ligação estiver presente; ver discussão posterior). O aumento de precisão necessário para identificar a localização dos genes responsáveis pela doença genética e permitir sua identificação e seu isolamento requer enfoques de mapeamento de alta resolução para mapear e clonar regiões do DNA até a seqüência de nucleotídeos (único par de bases), um nível de resolução bem abaixo da faixa dos métodos citogenéticos e de ligação.

Contigs de Cromossomos Artificiais

O mapeamento de alta resolução baseia-se no isolamento de um conjunto de grandes fragmentos superpostos de DNA (chamado de um **contig**) que inclui todo o segmento de DNA contíguo que contém tanto o gene de interesse quanto os marcadores genéticos usados para mapear o gene. Usando os métodos descritos no Cap. 4, estes grandes fragmentos em geral são isolados de bibliotecas de DNA humano clonado preparadas em uma variedade de **cromossomos artificiais de levedura** (YACs) ou de bactérias. Os YACs contêm fragmentos de até 1.000 kb. O isolamento de um contig de YACs contendo todos os marcadores na vizinhança de um gene de interesse é um modo rápido para isolar trechos consideráveis de DNA genômico em uma forma clonada adequada a uma análise posterior mais detalhada (Fig. 8.20). O segmento de DNA contido em cada YAC pode então ser subdividido construindo-se um contig de **cromossomos artificiais de bactérias** (BACs) superpostos que incluam o segmento de DNA contido no YAC. Os BACs geralmente contêm de 100 a 200 kb de DNA, são menores que os YACs e são adequados a uma subclonagem posterior em fragmentos cada vez menores e, finalmente, o seqüenciamento. Deste modo, a localização e a estrutura de um gene podem ser determinadas não só para a resolução de éxons e íntrons individuais, mas até sua seqüência real de DNA, incluindo as mutações responsáveis pela doença. As técnicas usadas para o mapeamento físico são mostradas e comparadas no Quadro 8.4.

Mapeamento Gênico Humano e Identificação de Genes de Doença

A aplicação do mapeamento gênico à genética médica teve um sucesso espetacular. A estratégia geral — o mapeamento da localização de um gene de doença pela análise de ligação para definir marcadores que sejam usados no diagnóstico de doenças e consulta genética, seguido de tentativas de clonar o gene com

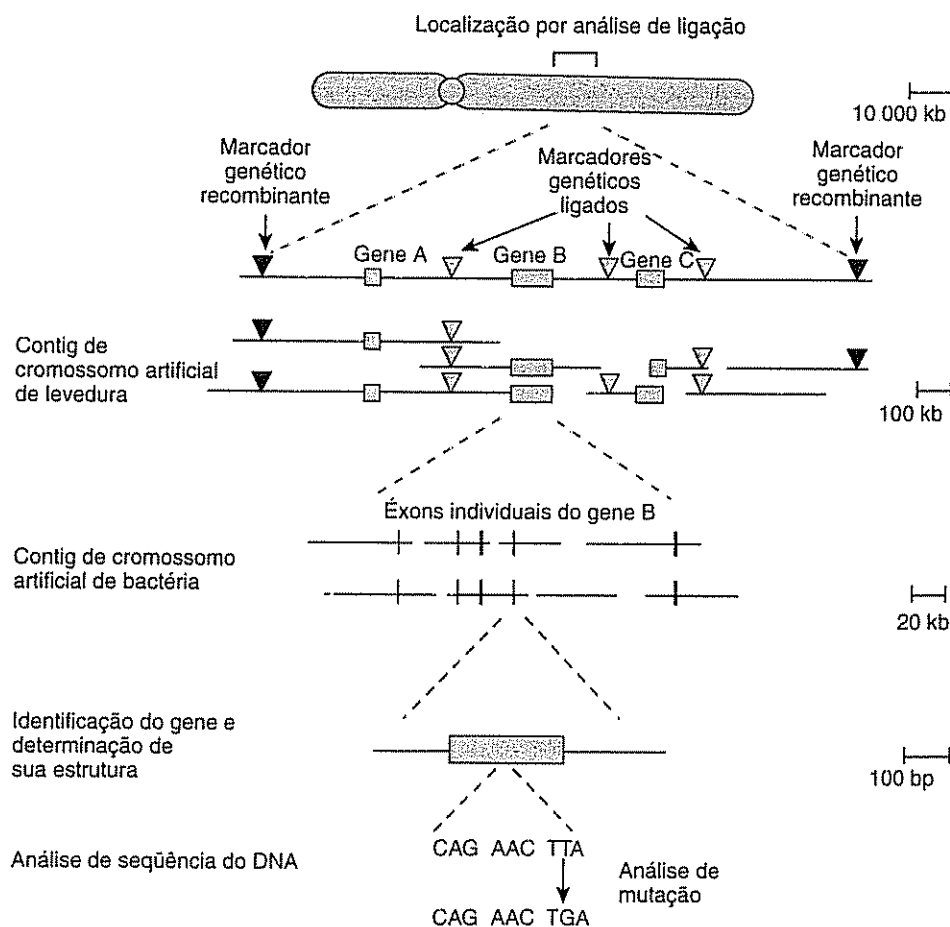



Fig. 8.20 Mapeamento de alta resolução para clonagem e análise de um gene hipotético de doença O mapeamento começa com a análise de ligação genética, com marcadores fortemente ligados dentro de um intervalo definido por marcadores flanqueadores que apresentam recombinação com o locus da doença A resolução aumenta a partir da análise de ligação para a clonagem em cromossomos artificiais de leveduras e cromossomos artificiais de bactérias, para isolamento gênico e caracterização, e finalmente para identificação de um defeito molecular pela determinação da seqüência de DNA

QUADRO 8-4

Métodos Usados em Mapeamento Gênico Físico

Método	Meta	Resolução Típica do Mapeamento (em pares de bases)
Híbridos de células somáticas roedor/humana	Localização no cromossomo	$50-250 \times 10^6$
Híbridos roedor/humano contendo cromossomos humanos rearranjados	Localização regional	$5-20 \times 10^6$
Mapeamento de híbrido de radiação	Localização regional	$3,5-5 \times 10^5$
Análise de dosagem gênica	Localização no cromossomo X e regional	$5-20 \times 10^6$
Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)	Identificação do cromossomo e localização regional dentro de uma banda cromossômica	$1-2 \times 10^6$
Mapeamento de restrição de longo alcance	Mapeamento fino da região gênica	$10^5 - 10^6$
FISH de fibra de cromatina	Mapeamento fino de região gênica e determinação da ordem de marcador	$10^5 - 10^6$
Clonagem em cromossomos artificiais	Clonagem gênica (fragmentos grandes)	$10^5 - 10^6$
Clonagem em bactérias	Clonagem gênica (fragmentos médios e pequenos)	$10^3 - 10^5$
Reação em cadeia da polimerase	Clonagem e mapeamento gênico	$10^2 - 10^4$
Seqüenciamento de DNA	Seqüência de nucleotídeos	1

base em sua posição de mapa — pode ser mais bem ilustrada por exemplos específicos. Os exemplos que serão discutidos ilustram vários enfoques. Um que seja bem-sucedido para uma determinada doença depende de características e circunstâncias únicas dessa doença.

O enfoque da clonagem de um gene que tome por base apenas sua *posição de mapa*, sem saber quase nada sobre o que o gene faz ou com que se parece, é chamado de **clonagem posicional**, a fim de distingui-la da estratégia alternativa para a identificação gênica na qual se inicia com uma proteína conhecida, determina-se sua seqüência de aminoácidos e usa-se esta informação para isolar o gene (ver Cap. 4).

Clonagem Posicional Usando Anomalias Cromossômicas Estruturais: Distrofia Muscular Duchenne

O gene *DMD* ligado ao X, no qual as mutações causam a distrofia muscular Duchenne e a forma alélica menos severa Becker (BMD), foi um dos primeiros genes de doença localizados por análise genética de ligação e um dos primeiros clonados por uma estratégia posicional. A genética molecular da DMD (e da BMD) e a natureza da proteína codificada, a distrofina, serão discutidas no Cap. 12. Uma vez que o gene foi localizado por análise de ligação em Xp21, a clonagem bem-sucedida do gene baseou-se em dois enfoques diferentes, ambos os quais usaram DNA de pacientes incomuns com DMD cuja doença era o resultado de anomalias estruturais envolvendo o cromossomo X.

No primeiro enfoque, o gene *DMD* foi clonado usando-se o DNA de um paciente que tinha DMD mais três outros distúrbios genéticos decorrentes da deleção de quatro genes resultantes de uma deleção citogeneticamente visível de Xp21 (ver Fig. 8.7). As seqüências de DNA de Xp21 que faltavam no cromossomo X do paciente foram isoladas e testadas em um grupo de meninos afetados *sem* a aparente deleção citogenética. Descobriu-se que alguns destes fragmentos também estavam deletados em pacientes com deleções muito menores, submicroscópicas. A análise posterior de alguns destes fragmentos revelou que eram éxons do gene *DMD*.

O segundo enfoque tirou proveito de amostras de DNA de mulheres com DMD. As mulheres com DMD são muito raras, pois a doença é recessiva ligada ao X, mas a etiologia da DMD nestas famílias ficou clara quando as investigações citogenéticas mostraram que as pacientes tinham translocações balanceadas X; autossomo (ver Cap. 10). O autossomo envolvido diferia em cada caso, mas o local da translocação do X era sempre o mesmo: Xp21. Os pesquisadores levantaram a hipótese de que a quebra em Xp21 perturbou o gene *DMD* nestas meninas. O DNA foi isolado do ponto de translocação X;autossomo e usado para procurar e identificar seqüências gênicas na vizinhança do ponto de quebra da translocação.

A clonagem do gene *DMD* e seu cDNA permitiu um intenso estudo do distúrbio e seu defeito básico. Ao contrário da situação da CF (ver a próxima seção), a maioria das mutações *DMD* deve-se a deleções gênicas parciais.

Clonagem Posicional Usando Mapeamento de Ligação Genética: Fibrose Cística

Devido à sua freqüência relativamente alta, em particular nas populações caucasianas, e à ausência quase absoluta de compreensão de sua patogenia fisiológica subjacente, a CF representa outro alvo importante para a clonagem posicional. Como não se encontrou nenhuma anomalia cromossômica estrutural envolvida na CF, o mapeamento de ligação genética foi usado para localizar e clonar o gene. Amostras de DNA de quase 50 famílias com CF foram analisadas quanto à ligação entre a CF e centenas de marcadores de DNA pelo genoma, até que finalmente se identificou uma ligação entre a CF e os marcadores no braço longo do cromossomo 7. A ligação a marcadores adicionais de DNA em 7q31 a q32 refinaram a localização do gene *CF* nesta região do cromossomo 7. Devido ao grande número de meioses disponíveis para estudo, foi possível identificar a localização do locus *CF* entre os loci *MET* e *D7S8*, dois marcadores distando cerca de 1.500 kb que foram vistos flanqueando o locus de *CF* pela inspeção de eventos de crossing. A localização do gene foi então ainda mais estreitada, para uma região com cerca de 500 kb, usando-se marcadores mais polimórficos entre *MET* e *D7S8* para encontrar crossings individuais adicionais em muitas centenas de famílias com CF estudadas em todo o mundo.

Desequilíbrio de Ligação na CF. Neste ponto, entretanto, surgiu uma característica incomum da genética da CF: embora os marcadores mais próximos ainda estivessem a alguma distân-

cia do gene *CF*, ficou claro que 90% dos cromossomos CF tinham um haplótipo particular em loci fortemente ligados à CF (alelos em acoplamento a estes loci da mutação *CF*), enquanto apenas cerca de 25% dos cromossomos normais (não-CF) tinham este haplótipo. Este resultado, que é conhecido como **desequilíbrio de ligação**, está em contradição com o equilíbrio de ligação em geral observado entre os marcadores ligados a uma doença, tal como com a NF1 (já discutida) ou a DMD, na qual os alelos em loci ligados ao gene da doença são diferentes em famílias diferentes. O desequilíbrio de ligação é definido como a associação prefencial de um gene de doença com determinados alelos em marcadores proximamente ligados. A interpretação usual do desequilíbrio de ligação é de que se trata de um efeito do fundador (ver Cap. 7) no qual a maioria dos cromossomos portadores da mutação da doença descende de um ancestral comum. O genótipo ancestral em marcadores no alelo mutante e ao redor dele persiste em uma freqüência desproporcionalmente alta nos cromossomos portadores da mutação da doença, como ilustra a Fig. 8.21, pois os marcadores são situados muito próximos ao gene para que a recombinação embaralhe alelos diferentes em acoplamento ao alelo da doença. Este modelo prevê que o mais alto grau de desequilíbrio deve ser encontrado mais perto da mutação da doença. Isto porque quanto mais perto estiverem o gene da doença e os marcadores no desequilíbrio de ligação, menos provável será que o alelo da doença e os alelos marcadores flanqueadores que estavam presentes no cromossomo ancestral tenham sido separados por crossing over ao longo das gerações. Portanto, para tirar proveito da existência do desequilíbrio de ligação para a clonagem posicional, devemos enfocar a atenção nas regiões com o mais alto grau de desequilíbrio, porque elas em geral estarão mais perto do sítio da mutação ancestral.

O gene *CF* foi isolado em 1989, após uma intensa série de investigações que ilustram a importância tanto do mapeamento físico quanto do mapeamento genético. Primeiro, todos os ge-

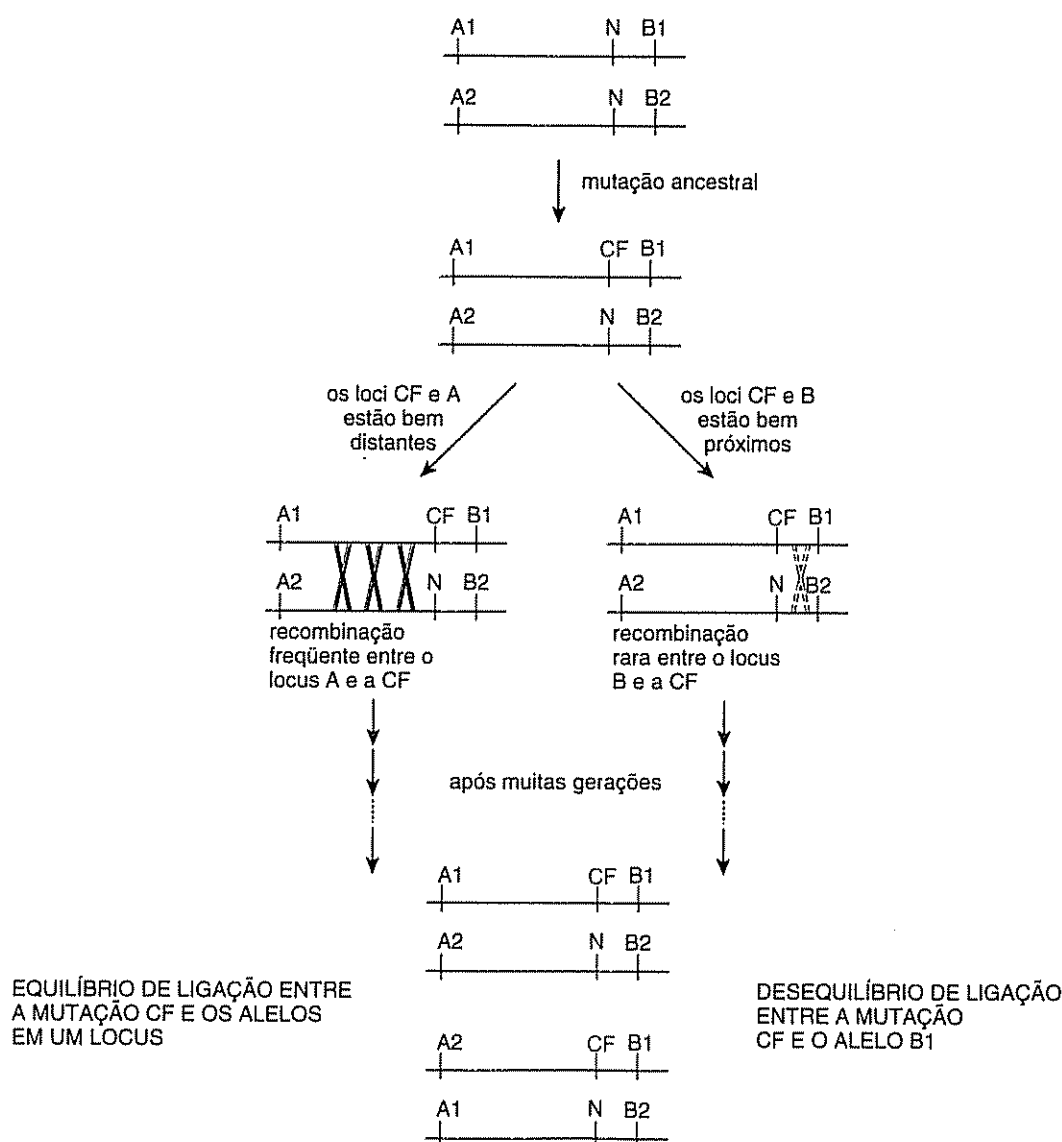



Fig. 8.21 Uma explicação para o desequilíbrio de ligação entre um locus de doença, tal como a fibrose cística, e um locus marcador proximamente ligado. As freqüências de haplótipos atingirão o equilíbrio se o locus marcador estiver distante o suficiente do locus da doença para que tenham ocorrido muitos crossings por muitas gerações, desde a época da mutação "ancestral" original. Para marcadores muito proximamente ligados ao locus da doença, ocorreu pouca recombinação e, portanto, a distribuição de alelos observada nos cromossomos com a mutação *CF* se assemelhará àquela presente no cromossomo quando ocorreu a mutação ancestral e não a distribuição atual de haplótipos na população.

nes situados no intervalo de 500 kb de DNA tido como contendo o gene de *CF* precisaram ser identificados. Foram usadas duas estratégias de identificação gênica: (1) a seqüência de DNA foi examinada quanto às regiões conservadas durante a evolução, pois as regiões conservadas mais provavelmente representam genes, e (2) os fragmentos de DNA da região foram testados para ver se continham os segmentos que correspondiam a mRNA transcritos. Quatro genes foram identificados dentro do intervalo que se sabia conter o gene *CF* por mapeamento de ligação. Apenas um dos genes mostrou um defeito molecular nos pacientes com CF: uma deleção de 3 pares de bases na seqüência codificante foi encontrada em cerca de 70% de todos os cromossomos CF nas populações da Europa setentrional, mas nunca nos alelos normais neste locus. Desde 1989, mais de 900 mutações diferentes que causam CF já foram identificadas em muitos grupos étnicos ao redor do mundo (ver Cap. 12).

Clonagem de Genes de Doença pela Combinação da Informação Funcional e Posicional: Retinite Pigmentosa

A doença ocular hereditária RP ilustra uma outra estratégia para identificar genes de doença. A RP é um grupo de doenças herdadas associadas à degeneração da retina que, a princípio, afeta predominantemente os bastonetes fotorreceptores. As características clínicas incluem visão noturna e periférica reduzidas nos primeiros estágios, mas a progressão para uma cegueira total é um resultado comum. A RP é a principal causa de cegueira nos seres humanos, com uma prevalência estimada de cerca de 1 em 4.000. Apenas com base em seu modo de herança, a RP apresenta uma clara heterogeneidade de locus, pois 30% dos heredogramas podem ser classificados como ligados ao X, enquanto o resto é autossômico (25% dominante, 45% recessivo).

A RP autossômica dominante foi ainda subclassificada clinicamente com base na idade de início e nos padrões diferenciais de degeneração de cones e bastonetes. Como esta heterogeneidade clínica levantou a possibilidade de vários loci responsáveis, os estudos de ligação concentraram-se em poucos heredogramas grandes em vez de em uma coleção de menores e revelaram pelo menos 12 loci distintos para as formas autossômicas dominantes de RP.

Em um grande heredograma irlandês, demonstrou-se uma ligação muito próxima da RP com um locus marcador no braço longo do cromossomo 3. O mapeamento da RP autossômica dominante no braço longo do cromossomo 3 sugeriu imediatamente um forte **gene candidato** para o locus *RP*: o gene para rodopsina, uma proteína crucial para a fotossensibilidade do bastonete. O gene para rodopsina também já havia sido situado no braço longo do cromossomo 3 e, portanto, as mutações neste gene podiam ser responsáveis pela RP nesta família. De fato, uma única mutação de bases foi identificada no gene de rodopsina nesta família, e mais de 100 outras mutações diferentes foram subseqüentemente encontradas no gene de rodopsina em outros pacientes com RP. Em outras famílias com RP autossômica dominante, o defeito herdado *não* co-segrega com os polimorfismos no locus de rodopsina. Nestas famílias, as mutações em outros genes autossômicos são responsáveis, e vários destes genes já foram identificados.

Genes de Doença Clonados pela Combinação da Informação Funcional e Posicional: Câncer de Cólon Não-Polipose Hereditário

Outro exemplo marcante de identificação de gene de doença bem-sucedido é ilustrado por uma síndrome de câncer de cólon familiar autossômico dominante conhecido como câncer de cólon não-polipose hereditário (HNPCC) (ver Cap. 16). O nome HNPCC é usado para distinguir esta forma de câncer de cólon autossômico dominante de outro distúrbio, a polipose adenomatosa familiar do cólon (FAP), na qual os pacientes desenvolvem de centenas a milhares de pólipos colônicos que sofrem transformação maligna (ver Cap. 16).

A análise de ligação em famílias com HNPCC autossômico dominante imediatamente revelou que havia heterogeneidade de locus: algumas famílias, mas não todas, apresentavam ligação com o braço curto do cromossomo 2 (chamada de *HNPCC1*), outras mostravam ligação com o cromossomo 3p (*HNPCC2*) e algumas não apresentavam ligação nem com 2p nem com 3p. De modo mais surpreendente, entretanto, quando os genótipos dos pacientes com a doença foram determinados tanto no sangue quanto no DNA do tumor usando marcadores microssatélites em 2p e em outra parte, descobriu-se que o DNA do câncer continha mais de dois alelos, muitos dos quais tinham tamanhos de repetição em tandem não encontrados no DNA do sangue do mesmo paciente. Estes numerosos alelos novos no tecido tumoral sugeriram que o DNA no tumor na verdade era instável e que curtos polimorfismos de repetição em tandem por todo o genoma não estavam se replicando fielmente durante a mitose. Tal **instabilidade de microssatélite**, mais bem discutida no Cap. 16, tinha sido vista antes: em uma levedura defeituosa para um gene de reparo de mau pareamento de DNA chamado *MSH2* (um acrônimo obscuro para o homólogo de *mutS*, um termo derivado da similaridade entre o gene de levedura e um gene de reparo de DNA bacteriano chamado *mutS*). Quando o gene humano mais proximamente relacionado a *MSH2* de levedura foi mapeado no cromossomo 2p16, o gene humano, também chamado *MSH2*, rapidamente se tornou o principal candidato para a HNPCC1. De fato, os pacientes com HNPCC ligado ao cromossomo 2p eram heterozigotos para mutações que inativam o gene humano *MSH2*. Os portadores de mutações *MSH2* desenvolvem câncer de cólon quando sua outra cópia normal do gene é perdida ou mutada em uma célula epitelial que reveste o cólon. O DNA nesta célula torna-se instável porque o reparo de mau pareamento durante a divisão celular é perturbado, levando a várias mutações secundárias, algumas das quais inevitavelmente inativam genes importantes para o controle do crescimento celular (ver Cap. 16).

A descoberta de mutações no gene *MSH2* como uma causa de uma grande porção de HNPCC (as famílias com HNPCC1 ligado ao cromossomo 2p) quase imediatamente levou à elucidação da causa genética do HNPCC em outras famílias cuja doença *não* estava ligada a 2p. Sabia-se que o cromossomo 3p era o local de outro gene humano, o *MLH1* (homólogo ao *mutL*), que apresentava grande similaridade com as proteínas de reparo de DNA *MLH1* em leveduras e *mutL* em bactérias. A descoberta do papel de *MSH2* no HNPCC1 tornou o *MLH1* um forte candidato ao gene envolvido no HNPCC2. Esta hipótese foi rapidamente confirmada pela descoberta de mutações *MLH1* em HNPCC2 (ver Cap. 16).

O Enfoque de Gene Candidato

A identificação da rodopsina como o produto do gene subjacente a pelo menos uma forma de RP autossômica dominante e a descoberta de *MSH2* e *MLH1* como causas de HNPCC ilustram como os genes de função conhecida podem se tornar fortes candidatos a loci de doenças quando (1) a função do gene está de algum modo correlacionada ao que se sabe sobre a patogenia da doença e (2) o gene candidato está mapeado na mesma região

do genoma que o gene da doença. Uma variedade de métodos para encontrar mutações (ver Cap. 4) é usada para triar o gene candidato para defeitos em um grupo de pacientes. Compare o enfoque do gene candidato com a metodologia puramente posicional usada para identificar os genes envolvidos na CF e na DMD: nestes casos, o isolamento bem-sucedido dos genes responsáveis não se baseou em nenhuma característica do gene que não a localização cromossômica.

O sucesso do enfoque do gene candidato ilustra muito bem o valor do mapeamento gênico. O gene da rodopsina foi inicialmente clonado e mapeado por motivos que não estavam relacionados à RP; *MSH2* e *MLH1* foram identificados em função de seu papel fundamental na proteção da fidelidade do DNA durante a replicação. Se estes genes não tivessem sido colocados no mapa gênico, entretanto, é improvável que o defeito nestes distúrbios tivesse sido descoberto tão depressa. O enfoque de gene candidato permite levantar e testar hipóteses sobre a causa de uma doença hereditária com base no fenótipo da doença (nos níveis clínico e celular), nas posições de mapa do locus da doença e do gene candidato e no papel das proteínas candidatas no tecido relevante.

Seqüências Marcadas Expressas

O enfoque posicional do gene candidato para clonar um gene de doença requer que a função e a posição do gene sejam conhecidas, de modo que se possa avaliar se o gene é um locus candidato razoável para a doença. Quanto mais genes forem conhecidos e mapeados, mais candidatos teremos uma vez que o gene da doença seja mapeado em um local do genoma. Além dos conhecidos, os genes mapeados citados em bancos de dados públicos, uma fonte suplementar importante de genes candidados aos loci de doenças é a crescente coleção de **seqüências marcadas expressas** (ESTs). As ESTs são seqüências parciais de cDNA obtidas por seqüenciamento de clones, escolhidas ao acaso, de uma ampla variedade de bibliotecas de cDNA feitas a partir de muitos tecidos diferentes (ver Cap. 4). Cada EST corresponde a um gene transcrito e cada seqüência EST é suficiente para especificar (ou "marcar") o gene ao qual ela corresponde unicamente. Embora a maioria das ESTs contenha seqüências que correspondem a genes desconhecidos e não-caracterizados, muitas têm homologia de seqüência a genes conhecidos em seres humanos e outros organismos, as quais fornecem alguns indícios quanto à função. Os bancos de dados computadorizados de genética molecular já contêm milhões de seqüências EST. À medida que mais e mais ESTs são mapeadas, os genes aos quais estas ESTs correspondem estão se tornando uma rica fonte de candidados adicionais a se considerar quando um gene de doença foi mapeado na vizinhança.

O PROJETO DO GENOMA HUMANO

Os geneticistas humanos e médicos vêm identificando e mapeando genes há décadas. Entretanto, uma mudança radical no enfoque "mapear o que puder" foi proposto em 1986 por Dulbecco, que sugeriu que se os cientistas realmente desejavam compreender o papel dos genes no câncer, sem mencionar os distúrbios genéticos em geral, o que eles tinham de fazer era seqüenciar todos os 3 bilhões de pares de bases e encontrar todos os genes! Após muita discussão e debate, nasceu o Projeto do Genoma Humano, um esforço internacional para primeiro mapear e eventualmente seqüenciar todos os estimados 50.000 genes. A ênfase inicial do projeto foi em construir mapas de ligação física e genética de todos os 22 autossomos e dos cromossomos sexuais e em reunir as coleções superpostas de clones, ou contigs, que cobrem cada cromossomo de telômero a telômero, de modo a facilitar a identificação de genes, isolar e seqüenciar o genoma humano inteiro.

O número de loci mapeados no genoma humano aumentou exponencialmente desde o início da década de 1980. É possível que nenhuma descrição faça justiça à enorme quantidade de informações sobre os genes humanos descobertos e mapeados que rapidamente está se acumulando ao longo do Projeto do Genoma Humano e outros esforços correlatos. Neste momento, as estratégias de mapeamento genético e físico contribuíram para o desenvolvimento de um mapa de genes humanos que agora inclui mais de 6.000 genes mapeados. Para muitos genes envolvidos em doenças humanas, os métodos de mapeamento podem ser imediatamente traduzidos em testes diagnósticos para detecção pré-sintomática ou pré-natal. Além disso, à medida que os genes relevantes de doenças forem clonados e caracterizados, muitos por estratégias de clonagem posicional, espera-se que um enorme aumento na compreensão da base molecular das doenças genéticas humanas venha a acontecer. Além do conhecimento dos genes de doenças que foram mapeados e caracterizados, há um número ainda maior de ESTs únicas mapeadas que representam genes adicionais que sabemos que devem ser transcritos em mRNA, mas suas seqüências totais são desconhecidas e suas funções estão sendo pesquisadas. Finalmente, à medida que o Projeto do Genoma Humano caminhar para sua conclusão, todos os cerca de 50.000 genes do genoma humano serão descobertos pelo seqüenciamento do DNA genômico e sua seqüência exata e posição de mapa serão conhecidas. Como ilustrado pelo enfoque do gene candidato, o envolvimento de muitos destes genes em uma condição inerente deverá se tornar aparente com o tempo. Hoje em dia, grande parte do progresso tem sido feito no que diz respeito aos distúrbios monogênicos, o que não é surpreendente, considerando-se a ênfase dos enfoques atuais na análise de heredogramas e detecção da ligação. No futuro, entretanto, é provável que mais progresso seja feito no que concerne à revelação dos componentes genéticos envolvidos em condições tais como a hipertensão, os distúrbios comportamentais e o câncer (ver Caps. 15 e 16). As estratégias de mapeamento gênico, juntamente com métodos sofisticados para a análise de heredogramas, estão começando a ser aplicadas nestes e em outros distúrbios mais complexos.

A aceleração do ritmo do mapeamento gênico e da descoberta de genes de doenças depende de avanços tecnológicos cruciais em duas áreas. Uma está no âmbito da biologia molecular. No Cap. 4 e neste capítulo, discutimos as técnicas subjacentes aos esforços para mapear e seqüenciar o genoma humano e descobrir genes de doença (ver Quadro 8.3). Ao lado do crescimento explosivo da tecnologia da biologia molecular, tem sido de igual importância o desenvolvimento e a expansão dos bancos de dados eletrônicos da informação genética de seres humanos e outros organismos. Estes bancos de dados, e os programas para análise e comparação de dados, permitem a integração de tipos díspares de dados, tais como a informação de seqüências de cDNA e genômica, mapas genéticos e físicos, estudos da estrutura e função gênica, descrições de fenótipos de doenças e catálogos de mutações responsáveis por doenças. A maioria destes bancos de dados está diretamente acessível no National Center for Biotechnology da National Library of Medicine, incluindo o Online Mendelian Inheritance in Man, ou por *links* da *homepage* do National Human Genome Research Institute.

Com o enfoque do Projeto do Genoma Humano no mapeamento dos genes humanos e no seqüenciamento, um mapa dos cerca de 50.000 genes humanos, incluindo a seqüência completa de pelo menos um genoma humano, estará disponível em breve. O enfoque combinado de análise de ligação para situar um determinado gene para um distúrbio herdado em uma região cromossômica específica, seguido da clonagem posicional ou das estratégias do gene candidato para identificar o gene responsável e estabelecer o defeito ou defeitos moleculares, continuará a gerar imensos frutos.

Referências Gerais

Green ED (2000) The Human Genome Project and its impact on the study of human disease. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

McKusick VA (1998) Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-Linked Phenotypes, 12th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Terwilliger JD, Ott J (1994) Handbook of Human Genetic Linkage. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

White R (1998) Mapping markers and genes in the human genome. *In* Singer M, Berg P (eds) Exploring Genetic Mechanisms. University Science Books, Sausalito, California, pp. 271–300.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Collins FS (1997) Sequencing the human genome. Hosp Practice 32:35–54.

Dulbecco R (1986) A turning point in cancer research: Sequencing the human genome. Science 231:1055–1056.

Gardiner K, Patterson D (1992) The role of somatic cell hybrids in physical mapping. Cytogenet Cell Genet 59:82–85

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz, D, et al (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. Science 245:1073–1080.

McCarthy LC (1996) Whole genome radiation hybrid mapping. Trends Genet 12:491–493.

The International Human Sequencing Consortium (2001) The human genome: Sequencing and initial analysis. Nature

White R, Lalouel JM (1988) Chromosome mapping with DNA markers. Sci Am 258:40–48.

Zallen DT, Burian RM (1992) On the beginnings of somatic cell hybridization: Boris Ephrussi and chromosome transplantation. Genetics 132:1–8.

URLs *para Bancos de Dados do Projeto do Genoma*

NHGRI *http://www.nhgri.nih.gov*. Homepage of National Human Genome Research Institute. Up-to-date information on the status of the Human Genome Project and access to detailed chromosome specific physical maps. Links to many other sites at *http://www.nhgri.nih.gov/Data/*

NCBI *http://www.ncbi.nlm.nih.gov*. National Center for Biotechnology Information, a division of the National Library of Medicine. DNA sequence repository for cloned genes, genomic sequence, and expressed sequence tags.

OMIM *http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim*. Online version of Mendelian Inheritance in Man. An online, searchable "knowledge base" of human genetic disorders including clinical description, genetic data, and molecular characterization of known disease genes.

Whitehead Genome Institute *http://www-genome.wi.mit.edu*. Genome Center based at the Whitehead Institute at the Massachusetts Institute of Technology. Physical contig maps of all human chromosomes.

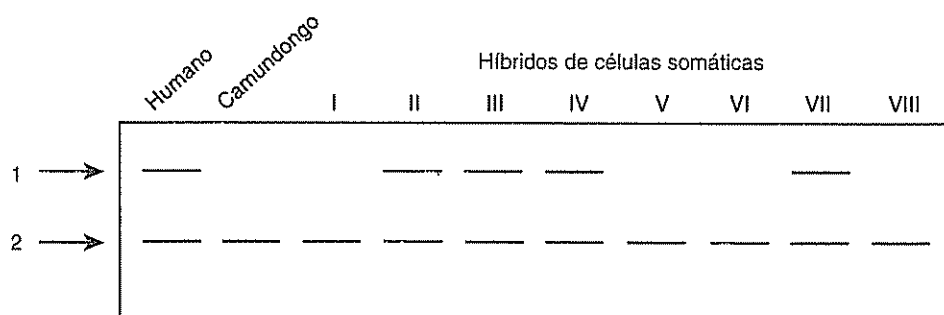
Cooperative Human Linkage Center *http://www.chlc.org*. United States Genetic Mapping Program. Extensive database of polymorphic markers and genetic maps.

Sanger Center *http://www.sanger.ac.uk/* Large-scale sequencing center at Sanger Center in Cambridge, England.

Généthon *http://www.genethon.fr/genethon_en.html*. French Genetic Mapping Program. Extensive database of polymorphic markers and genetic maps

Problemas

1. Descobriu-se que o locus da doença de Huntington (*HD*) está proximamente ligado a um polimorfismo de DNA no cromossomo 4. No mesmo estudo, entretanto, a ligação foi excluída entre *HD* e o locus para o polimorfismo do grupo sanguíneo MNSs, que também está mapeado no cromossomo 4. Qual é a explicação para isso?

2. O desequilíbrio de ligação foi uma observação importante na clonagem posicional do gene da fibrose cística. Fazendo correlações com os Caps. 5 e 12 quando necessário, você esperaria encontrar desequilíbrio de ligação para uma doença autossômica dominante tal como a HD? A neurofibromatose tipo 1? Por que sim ou por que não?

Dados da transferência de Southern da questão 3

3. Os dados mostrados na figura acima foram obtidos com uma sonda de cDNA humano para o gene *Q* no mesmo painel de híbridos de células somáticas roedor/humano analisados na Fig. 8.3 e no Quadro 8.1. O que você conclui sobre o fragmento 1 na transferência de Southern? E sobre o fragmento 2? Com relação ao Quadro 8.1, onde está mapeado o gene *Q*?

4. A ligação entre um polimorfismo no locus de α-globina no braço curto do cromossomo 16 e a doença do rim policístico autossômica dominante, uma condição comum e multiorgânica progressiva, foi analisada em uma série de famílias inglesas e holandesas, com os seguintes dados:

θ	0,00	0,01	0,10	0,20	0,30	0,40
Valores lod (Z)	$-\infty$	23,4	24,6	19,5	12,85	5,5

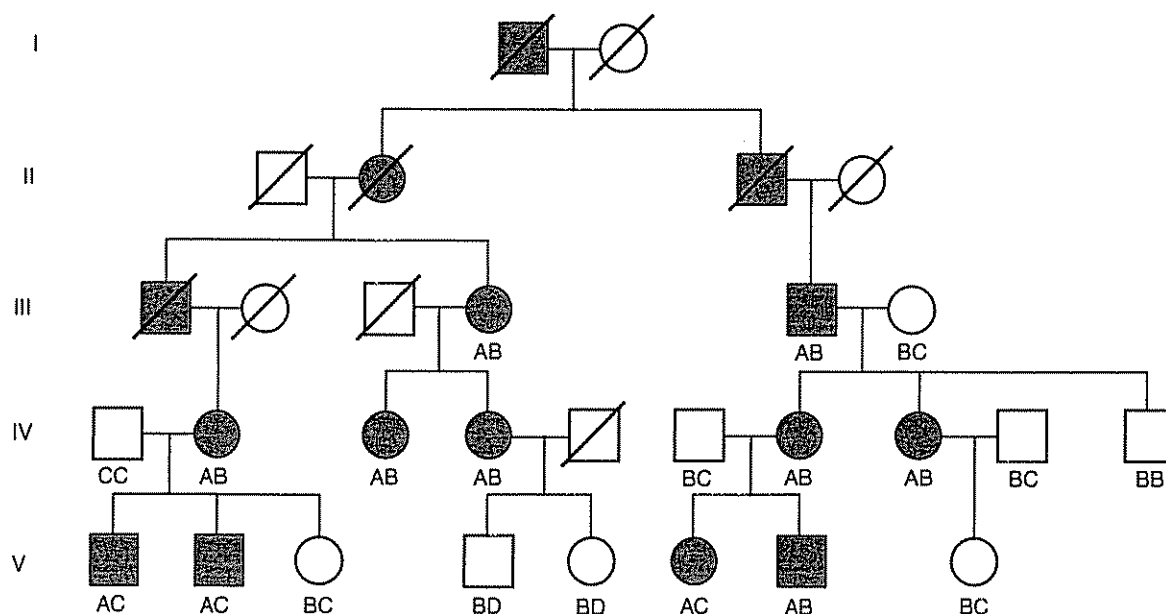
$Z_{max} = 25{,}85$ em $\theta_{max} = 0{,}05$

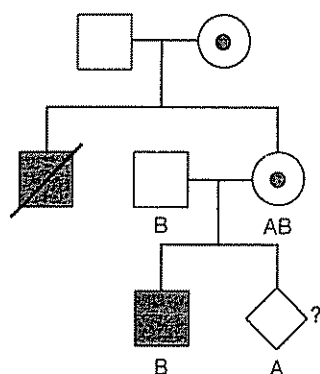
Como você interpreta estes dados?

Em um estudo subseqüente, uma grande família da Sicília com doença do rim policístico também foi investigada para ligação com α-globina, com os seguintes resultados:

θ	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40
Valores lod (Z)	$-\infty$	−8,34	−3,34	−1,05	−0,02

Como você interpreta os dados neste segundo estudo? Que implicações estes dados têm para uso na informação de ligação no diagnóstico pré-sintomático e na consulta genética?

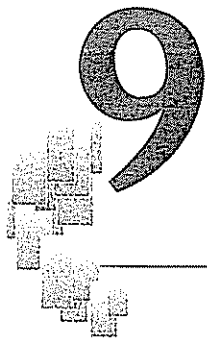
5 Os dados que se seguem foram obtidos em um estudo destinado a testar a hipótese de que um defeito em um gene para γ-cristalino, uma das principais proteínas do cristalino ocular, pode ser o responsável pelo defeito ocular herdado na catarata de Coppock, um distúrbio autossômico dominante. Os símbolos escuros no heredograma indicam os membros da família com catarata. As letras indicam haplótipos de DNA no locus polimórfico de γ-cristalino no cromossomo 2, detectado com um clone de cDNA. O que você concluiria por este estudo? Que estudos adicionais deveriam ser feitos para confirmar ou descartar a hipótese?

Heredograma da questão 5

6. O heredograma que se segue mostra um exemplo de diagnóstico molecular na síndrome de Wiskott-Aldrich, uma imunodeficiência ligada ao X, usando-se um polimorfismo de DNA ligado com uma distância de mapa de aproximadamente 5 cM entre o locus polimórfico e o gene da síndrome de Wiskott-Aldrich. Qual a provável fase na mãe portadora? Como você determina isto? Que diagnóstico você faria quanto ao atual diagnóstico pré-natal?

Heredograma das questões 6 e 7

7. Na família descrita na Questão 6, o avô materno torna-se disponível para teste de DNA e apresenta o alelo *B* no locus ligado. Como este achado afeta sua determinação da fase na mãe? O que você conclui sobre o filho afetado? Que outros estudos devem ser feitos para verficar isto? Que diagnóstico você faria com relação ao atual diagnóstico pré-natal?

8. Quais são algumas das implicações em conhecer a posição de mapa de um determinado gene para a genética médica? Em outras palavras, por que mapear os genes?

9. Qual a região do genoma para a qual o mapeamento de híbridos de radiação não é possível quando feito como descrito usando células $HPRT^-$ de roedores? Como esta região do genoma pode ser mapeada pelos híbridos de radiação?

9

Fundamentos de Citogenética Clínica

A citogenética clínica é o estudo dos cromossomos, de sua estrutura e sua herança aplicado à prática da genética médica. Há mais de 40 anos sabíamos que as mudanças microscopicamente visíveis no número ou na estrutura dos cromossomos poderiam responder por várias condições clínicas. Hoje em dia, a análise cromossômica, com uma resolução e uma precisão muitíssimo melhoradas, é um procedimento diagnóstico cada vez mais importante em várias áreas da medicina clínica.

Os distúrbios cromossômicos formam uma importante categoria de doenças genéticas. Eles contribuem para uma grande proporção de todas as perdas reprodutivas, malformações congênitas e retardo mental, tendo um importante papel na patogenia da malignidade. As anomalias cromossômicas específicas são responsáveis por mais de 100 síndromes identificáveis que, em termos coletivos, são mais comuns que todos os distúrbios mendelianos monogênicos juntos. Os distúrbios citogenéticos estão presentes em quase 1% dos nativivos, em cerca de 2% das gestações de mulheres com mais de 35 anos que tiveram diagnóstico pré-natal e em metade de todos os abortos espontâneos de primeiro trimestre.

Neste capítulo, discutiremos os princípios gerais da citogenética clínica e os vários tipos de anomalias numéricas e estruturais observadas em cariótipos humanos. Algumas das mais comuns e mais bem conhecidas anomalias dos autossomos e cromossomos sexuais serão descritas no próximo capítulo.

INTRODUÇÃO À CITOGENÉTICA

A morfologia geral e a organização dos cromossomos humanos, bem como sua composição molecular, foram introduzidas nos Caps. 2 e 3. Para fazer uma análise cromossômica para fins clínicos rotineiros, as células devem ser capazes de crescer e se dividir rapidamente em cultura. As células mais prontamente acessíveis que atendem a estes requisitos são os leucóticos, especificamente os linfócitos T. Para preparar uma cultura a curto prazo destas células adequadas para análise, uma amostra de sangue periférico é obtida, em geral por venipunção, e misturada com heparina para evitar a coagulação. Os leucócitos são coletados, colocados no meio de cultura e estimulados a se dividir. Após alguns dias, as células em divisão são bloqueadas na **metáfase** com substâncias químicas que inibem a formação do fuso mitótico, coletadas e tratadas com uma solução hipotônica para liberar os cromossomos. Os cromossomos são então fixados, espalhados em lâminas e corados por uma de várias técnicas, dependendo do procedimento diagnóstico que estiver sendo feito. Elas então estão prontas para análise.

Indicações Clínicas para a Análise Cromossômica

A análise cromossômica é indicada como um procedimento diagnóstico rotineiro para vários fenótipos específicos encontrados em clínica médica, como descrito neste capítulo e no Cap. 10. Além disso, também existem situações clínicas gerais inespecíficas e achados que indicam uma necessidade de análise citogenética:

1. **Problemas de crescimento e desenvolvimento iniciais.** Falta ou retardo do desenvolvimento, face dismórfica, malformações múltiplas, baixa estatura, genitália ambígua e retardo mental são achados freqüentes em crianças com anomalias cromossômicas, embora não sejam restritos a este grupo. A menos que exista um diagnóstico não-cromossômico definitivo, a análise cromossômica deve ser feita para pacientes que apresentam uma combinação de tais problemas.
2. **Natimorto e morte neonatal.** A incidência de anomalias cromossômicas é muito maior entre os natimortos (até aproximadamente 10%) que entre os nativivos (cerca de 0,7%). É também elevada entre crianças que morrem no período neonatal (cerca de 10%). A análise cromossômica deve ser feita em todos os natimortos e mortes neonatais que possam ter uma base citogenética para identificar uma causa possível específica ou, alternativamente, para excluir anomalias cromossômicas como motivo da perda. Em tais casos, a cariotipagem é essencial para uma consulta genética apurada e pode dar informações importantes para o diagnóstico pré-natal de futuras gestações.
3. **Problemas de fertilidade.** Os estudos cromossômicos são indicados para mulheres que apresentam amenorréia e para casais com uma história de infertilidade ou abortos recorrentes. Uma anomalia cromossômica é vista em um ou outro genitor em uma proporção significativa (de 3% a 6%) dos casos nos quais há infertilidade ou dois ou mais abortos.

4. **História familiar** Uma anomalia cromossômica suspeita ou conhecida em um parente em primeiro grau é uma indicação para a análise cromossômica em algumas circunstâncias.
5. **Neoplasia**. Absolutamente todos os cânceres estão associados a uma ou mais anomalias cromossômicas (ver Cap. 16). A avaliação cromossômica na amostra apropriada de tecido (o próprio tumor ou a medula óssea no caso de malignidades hematológicas) pode nos dar um diagnóstico útil ou uma informação prognóstica.
6. **Gestação em uma mulher com idade avançada**. Há um aumento de risco de anomalia cromossômica nos fetos concebidos por mulheres com mais de 30 a 35 anos de idade (ver Cap. 18). A análise cromossômica fetal deve ser oferecida como uma parte rotineira dos cuidados pré-natais em tais gestações.

Embora ideal para a análise clínica rápida, as culturas de células preparadas de sangue periférico têm a desvantagem de ter vida curta (de 3 a 4 dias). Culturas de longo termo podem ser feitas a partir de uma variedade de outros tecidos (ver Cap. 8). A biópsia de pele, um pequeno procedimento cirúrgico, pode fornecer amostras de tecido que em cultura produzem **fibroblastos**, os quais podem ser usados para uma variedade de estudos bioquímicos e moleculares, bem como para a análise cromossômica. Os leucócitos também podem ser transformados em cultura para formar linhagens celulares **linfoblastóides** que são potencialmente imortais. A **medula óssea** pode ser obtida apenas por procedimentos relativamente invasivos de biópsia de medula óssea, mas tem a vantagem de conter uma alta proporção de células em divisão, de modo que quase não é necessária uma cultura. Seu principal uso é no diagnóstico de malignidades hematológicas suspeitas. Sua desvantagem é que as preparações cromossômicas obtidas da medula são relativamente pobres, com cromossomos pouco resolvidos que são mais difíceis de analisar que os do sangue periférico. As **células fetais** derivadas do líquido amniótico (amniócitos) ou obtidas por biópsia das vilosidades coriônicas também podem ser cultivadas de forma bem-sucedida para a análise citogenética, bioquímica ou molecular. As células das vilosidades coriônicas também podem ser analisadas diretamente, sem a necessidade de cultura (ver Cap. 18 para maior discussão).

Identificação Cromossômica

Os 24 tipos de cromossomos humanos podem ser prontamente identificados por vários procedimentos específicos de coloração. Existem três métodos de coloração comumente usados que podem ser distintos entre os cromossomos humanos. No Cap. 2, examinamos os cromossomos corados por bandeamento Giemsa (**bandeamento G**), o método usado com mais freqüência em laboratórios clínicos. Outros procedimentos usados em alguns laboratórios ou para fins específicos, ou ambos, incluem os seguintes:

Bandeamento Q. Este método requer a coloração com quinacrina mustarda ou compostos correlatos e o exame por microscopia de fluorescência. Os cromossomos coram-se em um padrão específico de bandas claras e escuras (bandas Q), sendo que as bandas Q claras correspondem quase exatamente às bandas G escuras. O bandeamento Q, bem como o bandeamento C (ver seção seguinte), é particularmente útil para detectar variantes ocasionais na morfologia cromossômica ou coloração, chamadas de **heteromorfismos**. Estas variantes em geral são benignas e refletem diferenças na quantidade ou no tipo de seqüências de DNA satélite em um local específico ao longo do cromossomo.

Bandeamento R. Se os cromossomos receberem um tratamento especial (tal como aquecimento) antes da coloração, as bandas escuras e claras (bandas R) resultantes serão o reverso das produzidas pelo bandeamento G ou Q. Especialmente quando se examinam regiões que se coram pouco pelo bandeamento G ou Q, o bandeamento R fornece um padrão que é mais fácil de analisar que aquele fornecido pelo bandeamento G ou Q. Este é o método padrão em alguns laboratórios, particularmente na Europa.

Um sistema uniforme de classificação cromossômica é internacionalmente aceito para a identificação de cromossomos humanos corados por qualquer um dos três procedimentos de coloração mencionados. A Fig. 9.1 é um ideograma do padrão de bandeamento de um conjunto de cromossomos humanos normais na metáfase, ilustrando a alternância de padrões de bandas escuras e claras usadas para a identificação dos cromossomos. O padrão de bandas de cada cromossomo é numerado em cada braço do centrômero ao telômero, como mostrado em detalhe na Fig. 9.2 para vários cromossomos. Usando este sistema de numeração, a localização de cada banda em particular, bem como as seqüências de DNA e os genes dentro delas e o seu envolvimento em uma anomalia cromossômica, pode ser descrita sem ambigüidade e com precisão.

Os cromossomos humanos em geral são classificados pela posição do **centrômero** em três tipos que podem ser facilmente distintos na metáfase (ver Fig. 9.1): **metacêntricos**, com um centrômero mais ou menos no meio e braços aproximadamente do mesmo tamanho; **submetacêntricos**, com um centrômero fora do meio e braços com tamanhos claramente diferentes; e **acrocêntricos**, com o centrômero bem próximo a uma das pontas. Um quarto tipo potencial, **telocêntrico**, com o centrômero em uma extremidade e um único braço, não ocorre no cariótipo humano normal, mas é ocasionalmente observado em rearranjos cromossômicos e é um tipo comum em outras espécies. Os cromossomos acrocêntricos humanos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22) têm massas pequenas e distintas de cromatina, conhecidas como **satélites**, ligadas a seus braços curtos por pedículos finos (constrições secundárias). Os pedículos destes cinco pares de cromossomos contêm centenas de cópias de genes codificantes de RNA ribossômico.

Procedimentos Especiais

Para situações particulares, várias técnicas especializadas podem ser usadas:

Bandeamento C. Este método envolve especificamente a coloração da região centromérica de cada cromossomo e outras regiões que contêm a **heterocromatina constitutiva**: partes dos cromossomos 1q, 9q e 16q adjacentes ao centrômero e a parte distal de Yq. A heterocromatina é o tipo de cromatina definida por sua propriedade de permanecer em estado condensado e de se corar fortemente nas células que não se dividem (interfásicas).

Bandeamento de Alta Resolução (também chamado de **bandeamento pró-metafásico**). Este tipo de bandeamento é realizado pelas técnicas de bandeamento G ou R para corar os

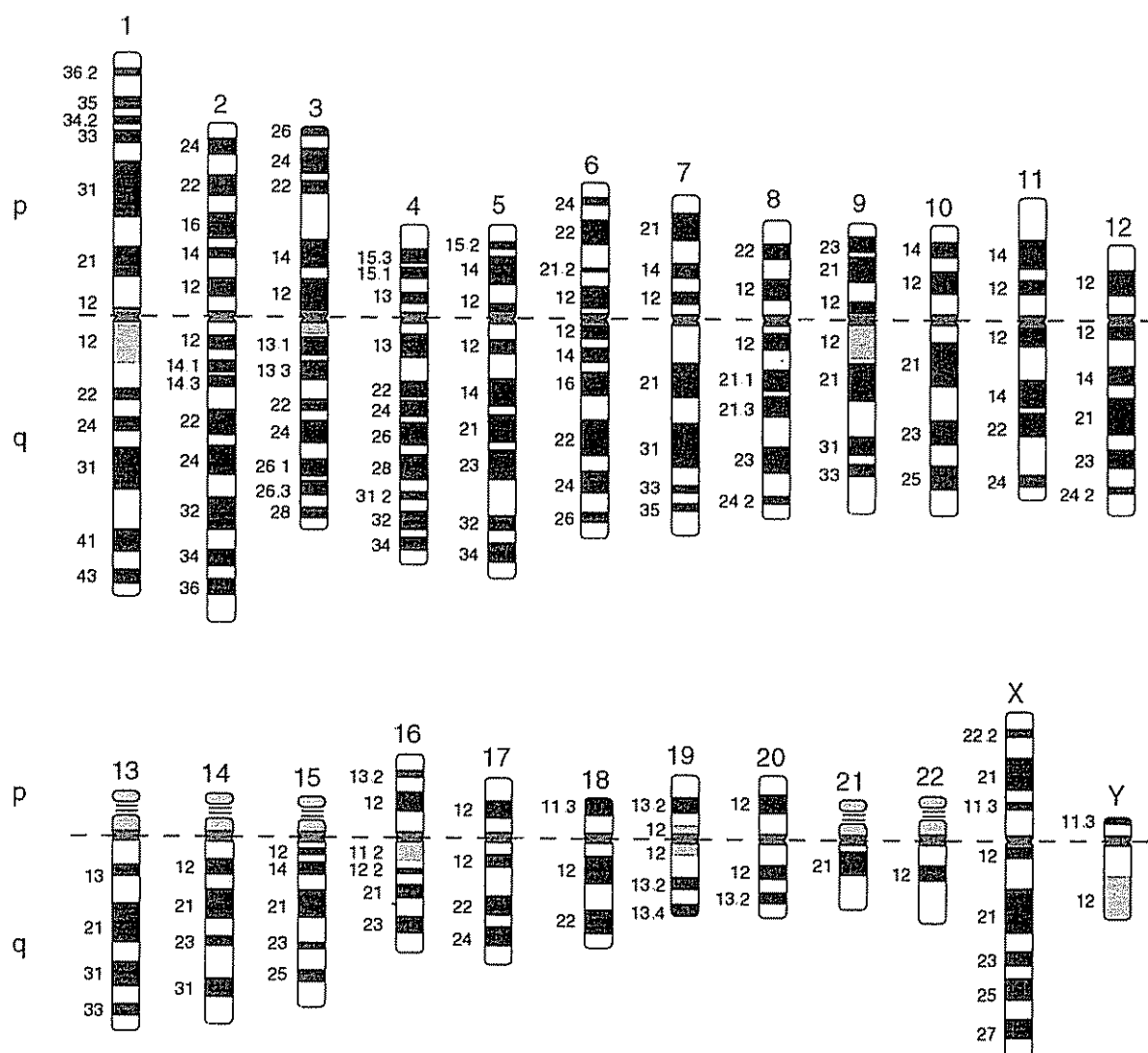



Fig. 9.1 Ideograma mostrando o padrão de bandeamento G para cromossomos humanos na metáfase, com cerca de 400 bandas por cariótipo haplóide. Como desenhado, os cromossomos são tipicamente representados com as cromátides irmãs tão juntas que elas não são reconhecidas como estruturas distintas. Os centrômeros são indicados pelas regiões em cinza-escuro separando os braços p e q. Por uma questão de conveniência e clareza, apenas as bandas G-positivas são numeradas. Para exemplos de um esquema totalmente numerado, ver a Fig. 9.2. (Redesenhado de ISCN, 1995.)

cromossomos que foram obtidos em um estágio inicial da mitose (prófase ou pró-metáfase), quando ainda estão em um estado relativamente descondensado (ver Cap. 2). O bandeamento de alta resolução é especialmente útil quando se suspeita de uma pequena anomalia estrutural de um cromossomo. Alguns laboratórios, entretanto, usam o bandeamento pró-metafásico de modo rotineiro, como mostram as Figs. 2.3 e 2.4. Os cromossomos pró-metafásicos revelam de 550 a 850 bandas ou ainda mais em um conjunto haplóide, enquanto as preparações metafásicas padrão mostram apenas cerca de 450. Uma comparação dos padrões de bandeamento do cromossomo X em três estágios diferentes de resolução é mostrada na Fig. 9.3. O aumento na precisão diagnóstica obtida com estes cromossomos mais longos é evidente.

Sítios Frágeis. Os sítios frágeis são espaços ocasionalmente observados em pontos característicos de vários cromossomos. Para demonstrar os sítios frágeis, em geral é necessário expor as células a condições de crescimento ou substâncias químicas que alteram ou inibem a síntese de DNA. Muitos sítios frágeis são conhecidos como variantes herdáveis. O sítio frágil mostrado de modo mais claro como sendo clinicamente significativo é visto perto da ponta de Xq tanto em homens com uma forma específica e comum de retardo mental ligado ao X quanto em algumas mulheres portadoras do mesmo defeito genético (ver discussão sobre a **síndrome do X frágil**, Cap. 12). Em conjunto com os testes moleculares para detectar a expansão da repetição CGG no gene *FMR1* característico deste distúrbio, a detecção do sítio frágil no cromossomo X é um procedimento diagnóstico específico para a síndrome do X frágil (ver Fig. 12.28).

Hibridização *In Situ* com Fluorescência

Como introduzido no Cap. 4, o desenvolvimento das técnicas de hibridização *in situ* com fluorescência (**FISH**) para examinar a presença ou a ausência de uma determinada seqüência de DNA ou para avaliar o número ou a organização de um cro-

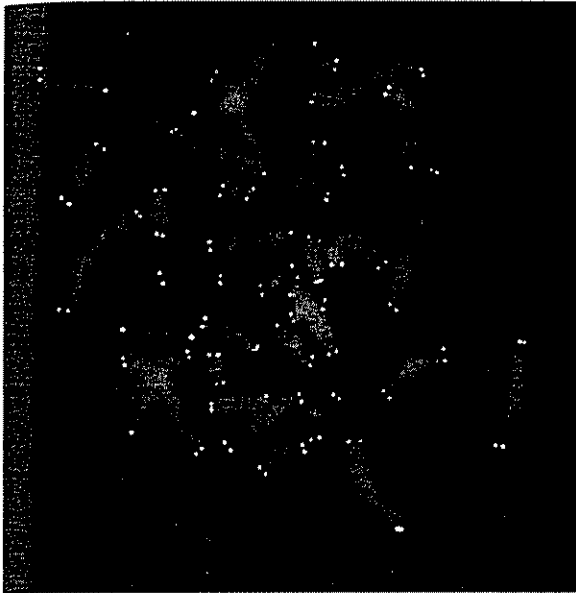



Fig. 9.5 A, Detecção de telômeros nas pontas de cada cromossomo por hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) usando uma sonda repetida TTAGGG As duas cromátides irmãs são evidentes pelo sinal amarelo de dupla hibridização na ponta da maioria dos braços cromossômicos (Cortesia de Stuart Schwartz, Case Western Reserve University and University Hospitals of Cleveland)

Fig. 9.5 B. Cariotipagem espectral (SKY) Vinte e quatro sondas de coloração cromossômica individual são marcadas com corantes fluorescentes diferentes e usadas como uma coloração genômica total Os sinais fluorescentes são analisados por um *software* sofisticado de imagem e armazenados em um computador Para gerar a fotografia, o computador atribui uma cor diferente a cada um dos 24 diferentes espectros fluorescentes gerados pelas sondas individuais de coloração cromossômica (Figura por cortesia da Dra Amalia Dutra, National Human Genome Research Institute) Nesta metáfase de uma mulher 46,XX, apenas 23 cores estão presentes; a única cor gerada pela sonda de coloração do cromossomo Y não é vista

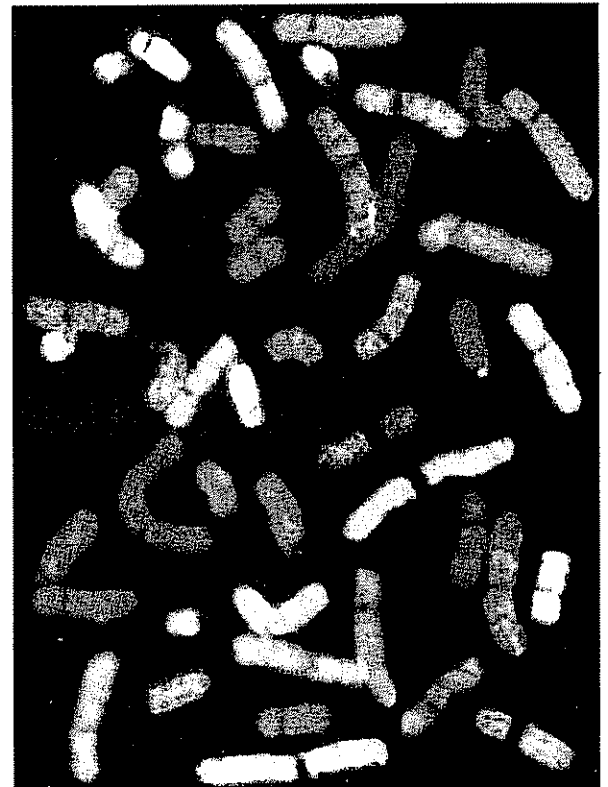
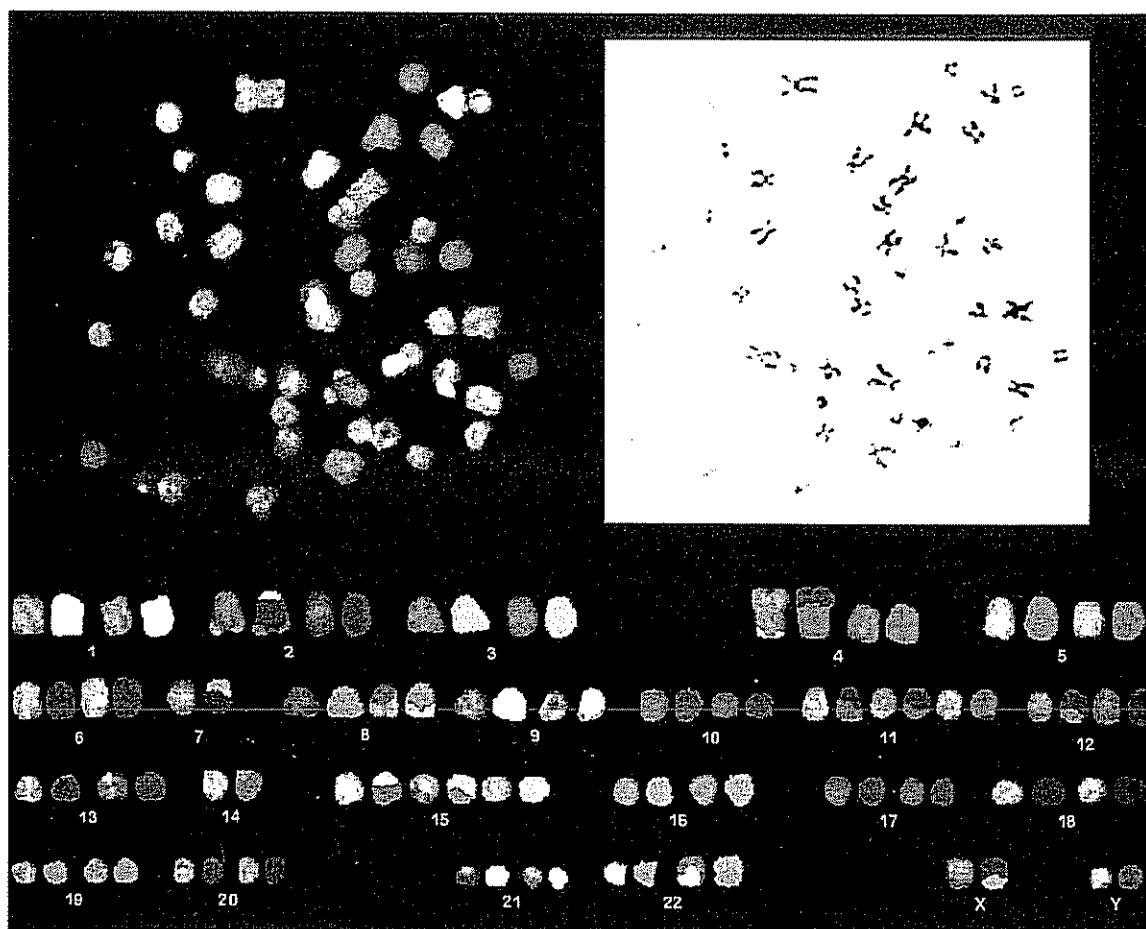



Fig. 9.5 C. Análise cariotípica espectral de cromossomos de uma linhagem celular de meduloblastoma Várias anomalias numéricas e estruturais são evidentes e podem ser identificadas pela análise da imagem das 24 sondas de coloração cromossômica usadas O cariótipo mostra tanto a imagem original (*membro à esquerda de cada par*) quanto a imagem falso-colorida (*membro à direita de cada par*), na qual cada um dos 24 tipos de cromossomos recebe uma cor diferente para ajudar a identificação visual (Cortesia de Amalia Dutra. National Human Genome Research Institute)

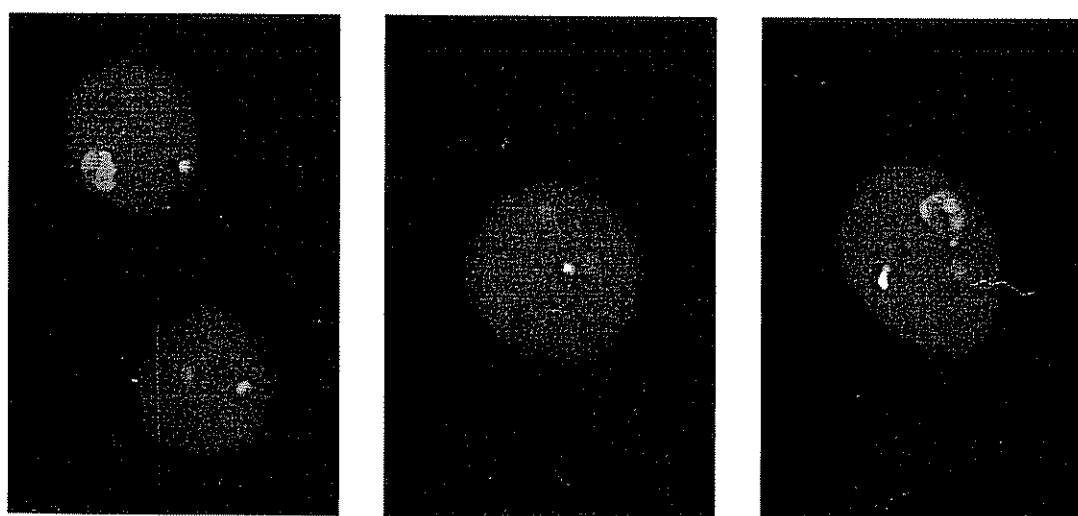



Fig. 9.5 D. Fluorescência tricolor de hibridização *in situ* para análise de espermatozóides humanos usando sondas repetitivas para o cromossomo 18 (*amarelo*). o cromossomo Y (*verde*) e o cromossomo X (*vermelho*) Os dois espermatozóides haplóides à esquerda são monossômicos para estes cromossomos (um espermatozóide 23.X e um 23.Y) O espermatozóide do painel do meio é dissômico para o cromossomo X (cariótipo 24,XX). enquanto o espermatozóide da direita é dissômico para os cromossomos sexuais (cariótipo 24.XY) (Cortesia de Terry Hassold. Case Western Reserve University School of Medicine. Cleveland)

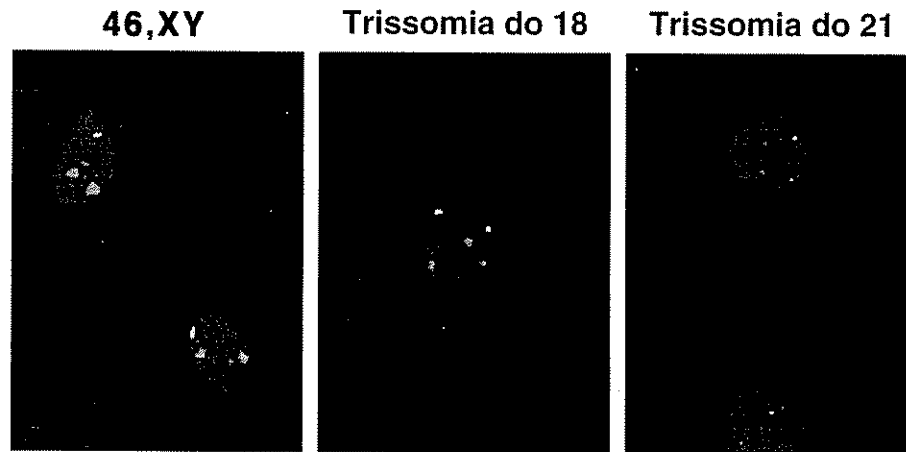



Fig. 9.5 E. Fluorescência multicor em análise de hibridização *in situ* de células interfásicas de líquido amniótico. *Painel da esquerda*, células 46,XY (cromossomo 18 azul, cromossomo X verde e cromossomo Y vermelho). *Painel médio*, célula 47,XX,+18 azul, cromossomo X em verde). *Painel da direita*, células com trissomia do 21 (cromossomo 13 em verde, cromossomo 21 em vermelho). (Cortesia de Stuart Schwartz, Case Western Reserve University e University Hospitals of Cleveland.)

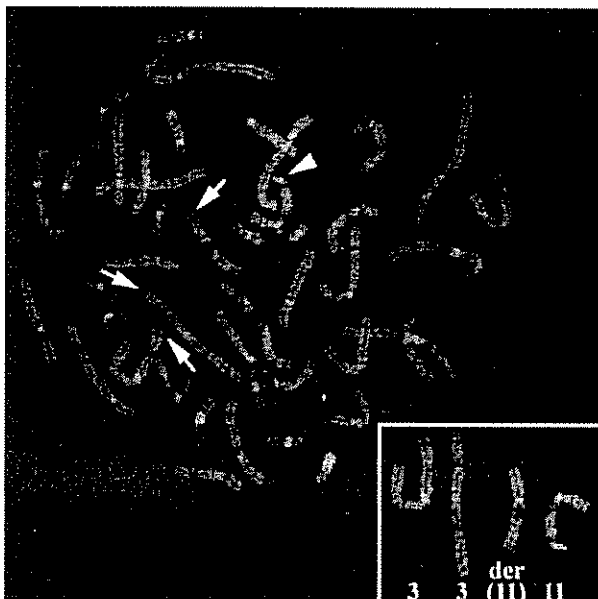



Fig. 9.5 F. Detecção por hibridização *in situ* com fluorescência de uma translocação críptica em um probando com retardo de desenvolvimento, usando sondas específicas para o telômero do cromossomo 3p (*vermelho*) e cromossomo 11q (*verde*). Uma translocação não balanceada entre 3p e 11q não era evidente pela análise padrão de bandeamento G, mas foi revelada por FISH. As setas mostram três sinais de hibridização em cromossomos 3p, indicativos de trissomia parcial de 3p, enquanto a ponta de seta mostra apenas um único sinal de hibridização para 11q, indicando monossomia parcial de 11q. (Cortesia de Christa Lese e David Ledbetter, University of Chicago.)

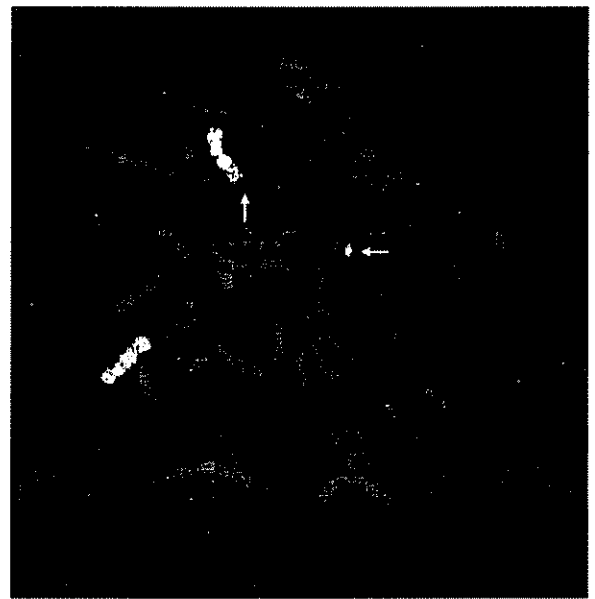



Fig. 9.5 G. Detecção por hibridização *in situ* com fluorescência de uma translocação balanceada entre os cromossomos 11 e 16 usando uma sonda de pintura do cromossomo 11 (*amarelo*). O cariótipo é 46,XY,t(11;16)(q24;q23). As setas indicam os produtos da translocação. (Cortesia de Stuart Schwartz, Case Western Reserve University e University Hospitals of Cleveland.)

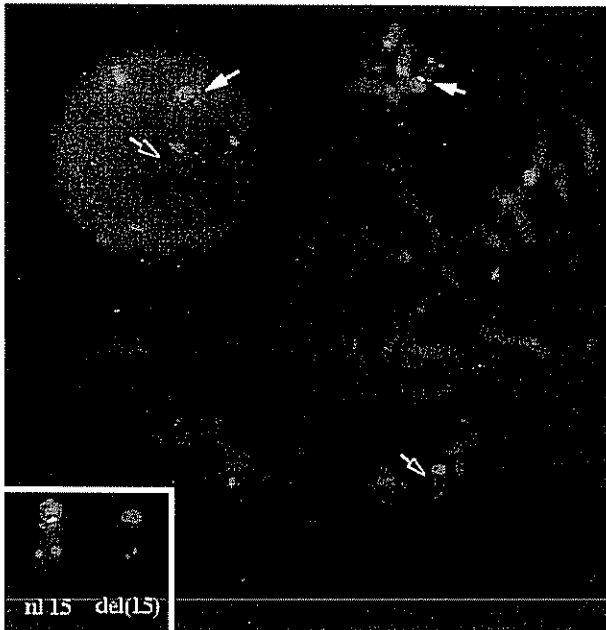



Fig. 9.5 H. Fluorescência bicolor na análise de hibridização *in situ* de um probando com a síndrome de Prader-Willi que demonstra a deleção de 15q11-q13 em um dos homólogos O sinal verde é a hibridização com o DNA alfa satélite no centrômero do cromossomo 15 O sinal vermelho em 15q distal é uma sonda controle de cópia única O sinal vermelho de 15q proximal é uma sonda para o gene SNRPN, que está presente em um cromossomo 15 (*seta branca*), mas está deletado no outro (*seta escura*) (Cortesia de Christa Lese e David Ledbetter. University of Chicago)

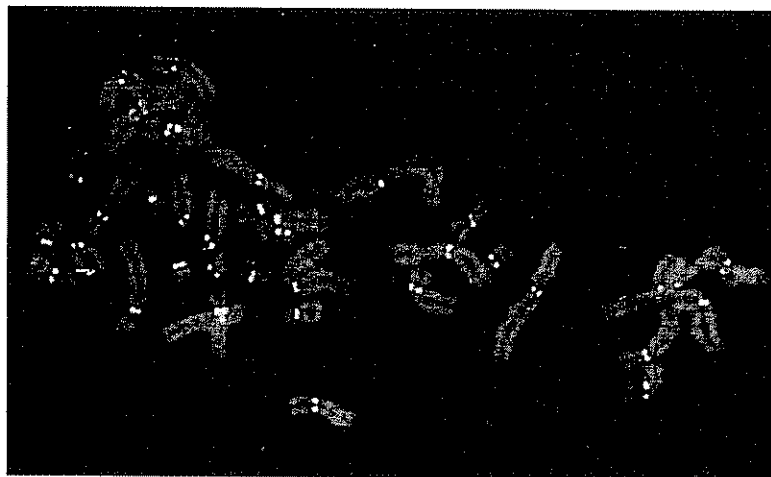



Fig. 9.5 I. Hibridização *in situ* de fluorescência combinada e análise de centrômero em um paciente 46,X,idic(X), com um isocromossomo dicêntrico do X Os cromossomos são corados em azul com DAPI, um corante de DNA Os sinais verdes pareados indicam centrômeros funcionais. detectados com anticorpos contra uma proteína específica para centrômeros/cinetócoros ativos Os centrômeros do X (*vermelho*) são detectados por FISH usando uma sonda específica de alfa satélite do X O X normal (com seu centrômero ativo) está à direita Um X dicêntrico está à esquerda e tem dois centrômeros ativos, pois ambos os centrômeros coram-se com o anticorpo (Cortesia de Anne Higgins. Case Western Reserve University School of Medicine. Cleveland)

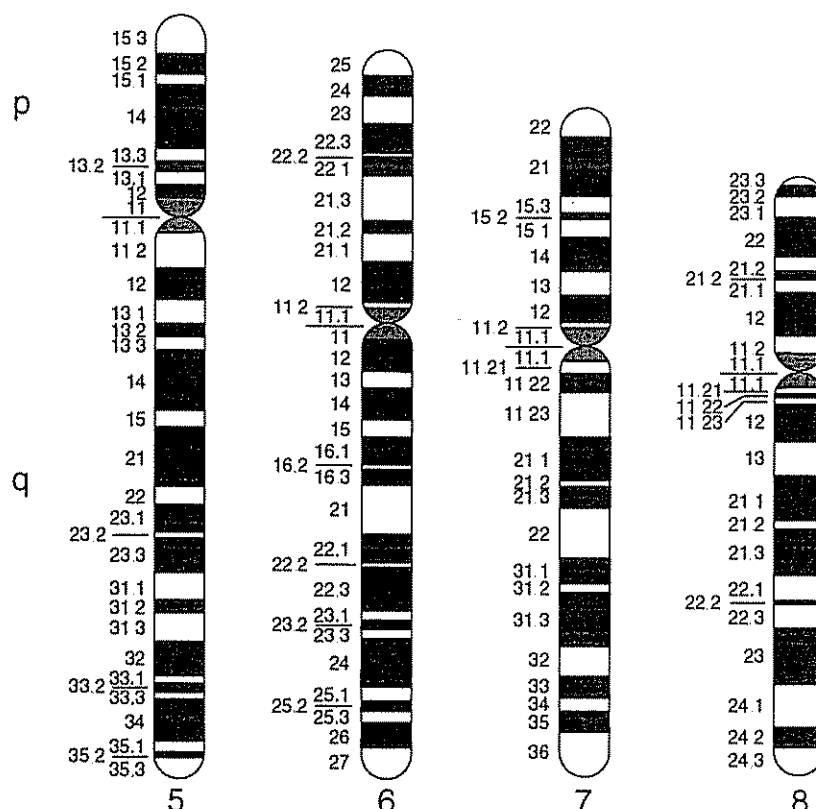



Fig. 9.2 Exemplos de padrões de bandeamento G para os cromossomos 5, 6, 7 e 8 no estágio de condensação de 550 bandas. Os números das bandas permitem a identificação não-ambígua de cada banda G-positiva ou G-negativa, por exemplo, o cromossomo 5p15.2 ou o cromossomo 8q24.2. (Redesenhado de ISCN, 1995.)

mossomo ou de uma região cromossômica revolucionou tanto a pesquisa quanto a citogenética clínica. Esta confluência dos enfoques molecular e citogenético — a **citogenética molecular** — ampliou muito tanto a gama quanto a precisão da análise cromossômica rotineira.

Na FISH, sondas de DNA específicas para cromossomos individuais, regiões cromossômicas ou genes podem ser usadas para identificar certos rearranjos cromossômicos ou diagnosticar rapidamente a existência de um número cromossômico anormal em material clínico (Fig. 9.4). Sondas adequadas podem ser preparadas por qualquer uma das várias técnicas in-

Fig. 9.3 O cromossomo X: ideogramas e fotomicrografias em metáfase, pró-metáfase e prófase (*esquerda* para *direita*). (Ideogramas redesenhados de ISCN, 1995; fotomicrografias por cortesia de Yim Kwan Ng, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

troduzidas no Cap. 4. Sondas específicas de genes ou de locus podem ser usadas para detectar a presença, a ausência ou a localização de um determinado gene (ver Fig. 8.8) tanto em cromossomos metafásicos quanto em células interfásicas. Sondas de DNA repetitivo permitem a detecção de DNA satélite ou outros elementos de DNA repetido (tais como o hexâmero repetido TTAGGG encontrado nos telômeros humanos) (ver Fig. 9.5A, *encarte em cores*) em loci cromossômicos específicos, incluindo centrômeros, telômeros ou regiões de heterocromatina; as sondas de DNA satélite, especialmente as que pertencem à família de alfa satélite das repetições centroméricas (ver Cap. 3), são muito úteis para determinar o número de cópias de um determinado cromossomo (ver Fig. 9.4). Finalmente, as sondas para cromossomos inteiros ou braços cromossômicos contêm uma mistura de cópias únicas de seqüências de DNA que estão mapeadas ao longo de todo o cromossomo (ou braço). Estas sondas "pintam" o cromossomo-alvo (tanto na metáfase quanto na interfase). Uma comparação das duas imagens, como na Fig. 9.4, documenta visualmente a natureza dinâmica da condensação e da descondensação cromossômica durante o ciclo celular, como introduzido no Cap. 2 (compare com a Fig. 2.5).

Uma das aplicações mais importantes da tecnologia FISH em citogenética clínica envolve o uso de fluorocromos diferentes para detectar múltiplas sondas simultaneamente. As aplicações bicolores e tricolores são rotineiramente usadas para diagnosticar deleções específicas, duplicações ou rearranjos tanto em preparações pró-metafásicas quanto metafásicas, bem como na interfase. Com procedimentos de imagem altamente especializados, é possível até mesmo detectar e distinguir 24 cores diferen-

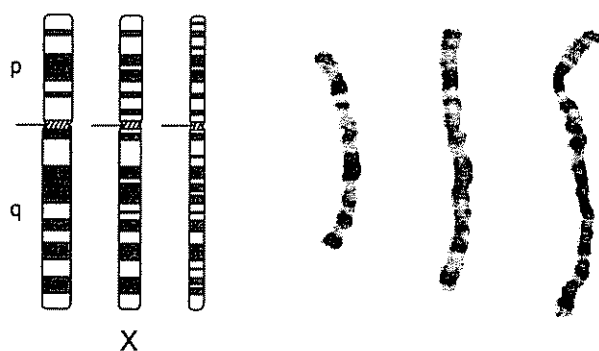
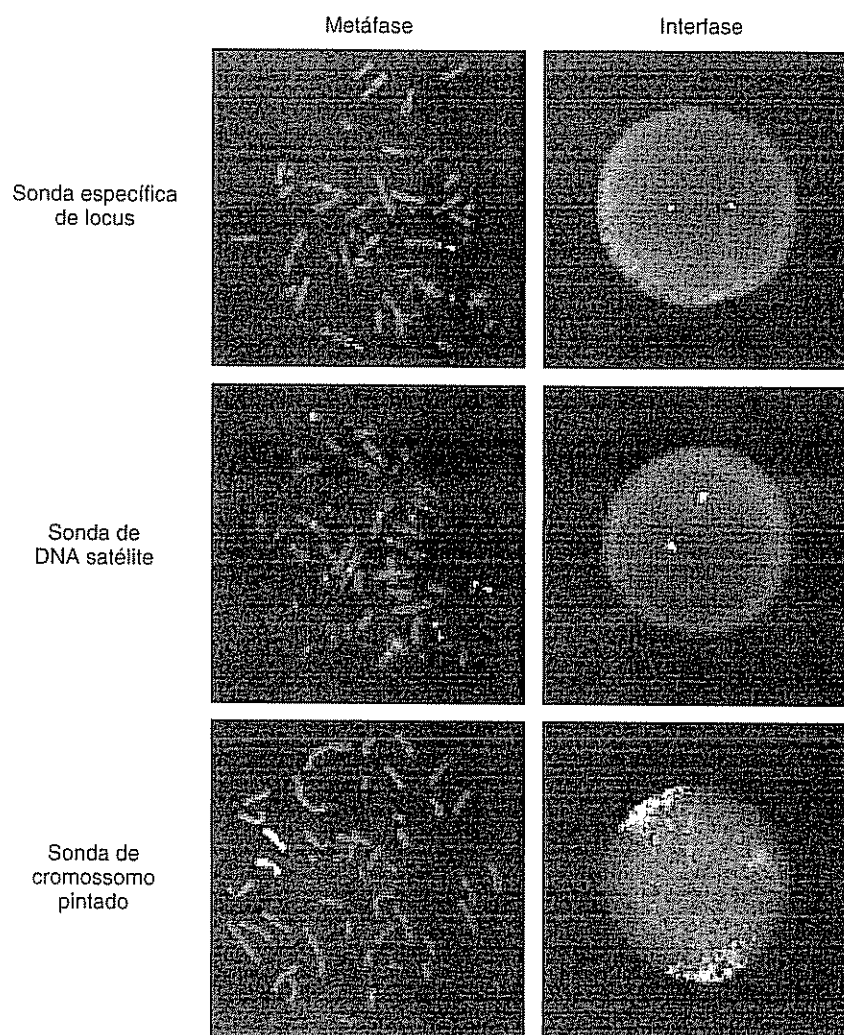



Fig. 9.4 Hibridização *in situ* com fluorescência para cromossomos humanos em metáfase e interfase usando três tipos diferentes de sondas de DNA. *Em cima*. Uma única cópia de sonda de DNA específica para o gene de fator VIII no cromossomo X. *Meio*. Uma sonda de DNA repetitivo alfa satélite específica para o centrômero do cromossomo 17. *Embaixo*. Uma sonda de cromossomo "pintado" específica para o cromossomo X. (Imagens por cortesia de Karen Gustashaw. Case Western Reserve University.)

tes simultaneamente na cariotipagem espectral (SKY; ver Cap. 4), o que permite uma enorme avaliação do cariótipo em um único experimento (ver Figs. 9.5B e 9.5C, *encarte em cores*).

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

As anomalias cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais e podem envolver um ou mais autossomos, os cromossomos sexuais ou ambos, simultaneamente. O tipo mais comum de anomalia cromossômica significativa em termos clínicos é claramente a **aneuploidia**, um número anormal de cromossomos devido a um cromossomo extra ou faltando, que está sempre associado à deficiência de desenvolvimento físico ou mental, ou ambos. As **translocações recíprocas** (uma troca de segmentos entre cromossomos não-homólogos) também são relativamente comuns, mas em geral não têm efeito fenotípico, embora, como explicado mais adiante, possa haver um aumento de risco associado de prole anormal. O impacto clínico e social das anomalias cromossômicas é enorme. As freqüências relativas das anomalias numéricas e estruturais observadas nos abortos espontâneos, nos fetos de mães com mais de 35 anos de idade que são estudados na amniocentese e nos nativivos são apresentadas no Quadro 9.1.

As anomalias cromossômicas são descritas usando um conjunto padrão de abreviações e nomenclatura. Estas observações e exemplos de cariótipos anormais são citados no Quadro 9.2.

Anomalias Cromossômicas Numéricas

Um complemento cromossômico com qualquer número de cromossomos que não o de 46 é dito como sendo **heteroplóide**. Um múltiplo exato do número cromossômico haplóide (n) é chamado de **euplóide** e qualquer outro número de cromossomos é chamado de **aneuplóide**.

Triploidia e Tetraploidia

Além do número diplóide (2n) característico das células somáticas normais, dois outros complementos cromossômicos euplóides, **triplóide** (3n) e **tetraplóide** (4n), são ocasionalmente relatados. Tanto a triploidia quanto a tetraploidia têm sido vistas em fetos, e embora as crianças triplóides possam nascer vivas, elas não so-

QUADRO 9–1

Incidência de Anomalias Cromossômicas em Diferentes Estágios da Vida Fetal ou Pós-natal

Cariótipo Anormal	Abortos de 1.º Trimestre	Fetos de Mães > 35 Anos*	Nativivos
Incidência total	1/2	1/50	1/160
Porcentagem de anomalias			
Anomalias numéricas	96%	85%	60%
Anomalias estruturais			
Balanceado	—	10%	30%
Não-balanceado	4%	5%	10%

*Estudado em amniocentese; dados resumidos de Hsu L. Y. F. (1998) Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. *In* Milunsky A. (ed) Genetic Disorders and the Fetus, 4.ª ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 179-248.

QUADRO 9–2

Algumas Abreviações Usadas para a Descrição de Cromossomos e Suas Anomalias e Exemplos Representativos

Abreviação	Significado	Exemplo	Condição
		46,XX	Cariótipo feminino normal
		46,XY	Cariótipo masculino normal
cen	centrômero		
del	deleção	46,XX,del(5p)	Mulher com síndrome do *cri du chat* devida à deleção de parte do braço curto de um cromossomo 5
der	cromossomo derivativo	der(1)	Cromossomo translocado derivado do cromossomo 1 e contendo o centrômero do cromossomo 1
dic	cromossomo dicêntrico	dic(X;Y)	Cromossomo translocado contendo centrômeros dos cromossomos X e Y
dup	duplicação		
fra	sítio frágil	46,Y,fra(X)(q27.3)	Homem com cromossomo X frágil
i	isocromossomo	46,X,i(Xq)	Mulher com isocromossomo do braço longo do cromossomo X
ins	inserção		
inv	inversão	inv(3)(p25q21)	Inversão pericêntrica do cromossomo 3
mar	cromossomo marcador	47,XY,+mar	Mulher com um cromossomo extra não identificado
mat	origem materna	47,XY,+der(1)mat	Homem com cromossomo adicional der(1) translocado herdado de sua mãe
p	braço curto de cromossomo		
pat	origem paterna		
q	braço longo de cromossomo		
r	cromossomo em anel	46,X,r(X)	Mulher com cromossomo X em anel
rcp	translocação recíproca		
rob	translocação robertsoniana		
t	translocação	46,XX,t(2;8)(q21;p13)	Mulher com translocação balanceada entre o cromossomo 2 e o cromossomo 8, com quebras em 2q21 e 8p13
ter	término	46,X,Xq−(pter→q21:)	Mulher com deleção parcial do braço longo de Xq21 a Xqter (a nomenclatura mostra a parte do cromossomo que está presente)
+	ganho de	47,XX, +21	Mulher com trissomia do 21
−	perda de	45,XX, −14, −21,rob(14q21q)	Mulher normal portadora de uma translocação robertsoniana entre os braços longos dos cromossomos 14 e 21; o cariótipo não tem um 14 normal e um 21 normal
		4p−	Cromossomo 4 com uma parte do braço curto deletada
:	quebra	5qter→5p15:	Cromossomo 5 deletado em um paciente com síndrome do *cri du chat*, com um ponto de quebra de deleção na banda p15
::	quebra e união	2pter→2q21::8p13→8pter	Descrição da porção der(2) de t(2;8)
/	mosaicismo	46,XX/47,XX,+8	Mulher com duas populações de células, uma com um cariótipo normal e uma com trissomia do 8

Abreviações de ICSN (1995) Relato do Standing Committee of Human Cytogenetic Nomenclature (1995), Karger, Basel.

brevivem muito tempo. A triploidia resulta com mais freqüência da fertilização de dois espermatozóides (dispermia). A falha de uma das divisões meióticas, resultando em um ovócito ou espermatozóide diplóide, também responde por uma parte dos casos. A expressão fenotípica de um cariótipo triplóide depende da fonte do conjunto cromossômico extra. Triplóides com um conjunto extra de cromossomos paternos têm tipicamente uma placenta anormal e são classificados como **molas hidatidiformes parciais** (ver seção mais adiante), mas aqueles com um conjunto adicional de cromossomos maternos são abortados espontaneamente no início da gestação. Os tetraplóides são sempre 92,XXXX ou 92,XXYY, o que sugere que a tetraploidia resulta da falha em completar uma divisão de clivagem inicial do zigoto.

ANEUPLOIDIA

A aneuploidia é o tipo mais comum e significativo em termos clínicos de distúrbio cromossômico humano, ocorrendo em pelo menos de 3% a 4% de todas as gestações clinicamente reconhecidas. A maioria dos pacientes aneuplóides tem ou **trissomia** (três em vez do par normal de um determinado cromossomo) ou, com menos freqüência, **monossomia** (apenas um representante de um determinado cromossomo). A trissomia ou a monossomia podem ter conseqüências fenotípicas.

A trissomia pode existir para qualquer parte do genoma, mas a trissomia de um cromossomo inteiro raramente é compatível com a vida. O tipo mais comum de trissomia nas crianças nativivas é a **trissomia do 21** (cariótipo 47, XX ou XY, +21), a constituição cromossômica vista em 95% dos pacientes com síndrome de Down (Fig. 9.6). A monossomia de um cromossomo inteiro quase sempre é letal. Uma exceção importante é a monossomia do cromossomo X, como visto na síndrome de Turner. Tanto a síndrome de Down quanto a síndrome de Turner serão descritas em maiores detalhes no Cap. 10.

Embora as causas da aneuploidia não sejam bem compreendidas, sabemos que o mecanismo cromossômico mais comum é a **não-disjunção** meiótica. Isto se refere à falha de um par de cromossomos em se separar corretamente durante uma das duas divisões meióticas, geralmente durante a meiose I. As conseqüências da não-disjunção durante a meiose I e a meiose II são diferentes (Fig. 9.7). Se o erro ocorrer durante a meiose I, o gameta com 24 cromossomos conterá tanto os membros paterno quanto materno do par. Se ocorrer durante a meiose II, o gameta com o cromossomo extra conterá ambas as cópias do cromossomo paterno ou materno. (Estritamente falando, as afirmativas mencionadas referem-se apenas ao centrômero paterno ou materno, pois a recombinação entre os cromossomos homólogos em geral ocorre na meiose I anterior, resultando em algumas diferenças genéticas entre as cromátides e, portanto, entre os correspondentes cromossomos filhos; ver Cap. 2). A propensão de um par cromossômico de não se disjuntar tem sido fortemente associada a aberrações na freqüência ou disposição, ou ambas, dos eventos de recombinação na meiose I. Um par de cromossomos com poucas recombinações ou com recombinações muito próximas ao centrômero ou telômero podem ser mais suscetíveis à não-disjunção que um par cromossômico com um número mais típico e distribuição dos eventos de recombinação.

Além da não-disjunção clássica, na qual a segregação imprópria dos cromossomos resulta de uma falha no pareamento ou

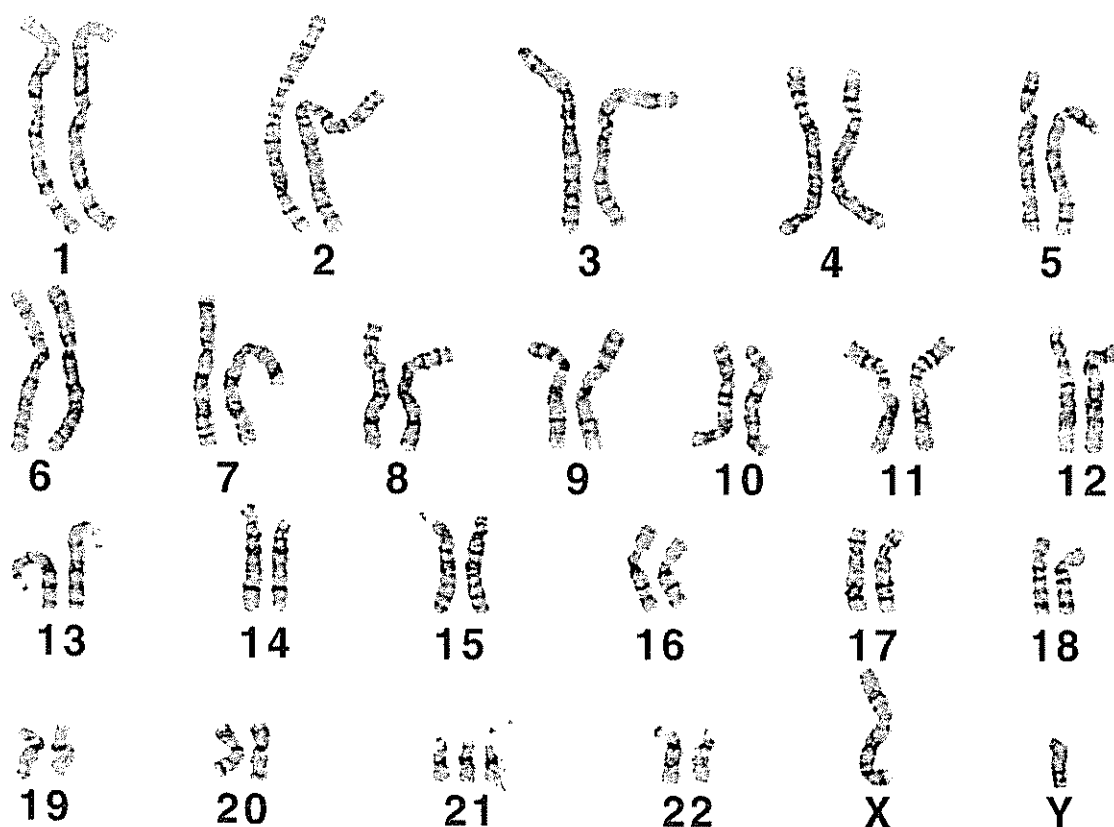



Fig. 9.6 Cariótipo de um paciente masculino com síndrome de Down mostrando três cópias do cromossomo 21. (Cortesia do Center for Human Genetics Laboratory, University Hospitals of Cleveland.)

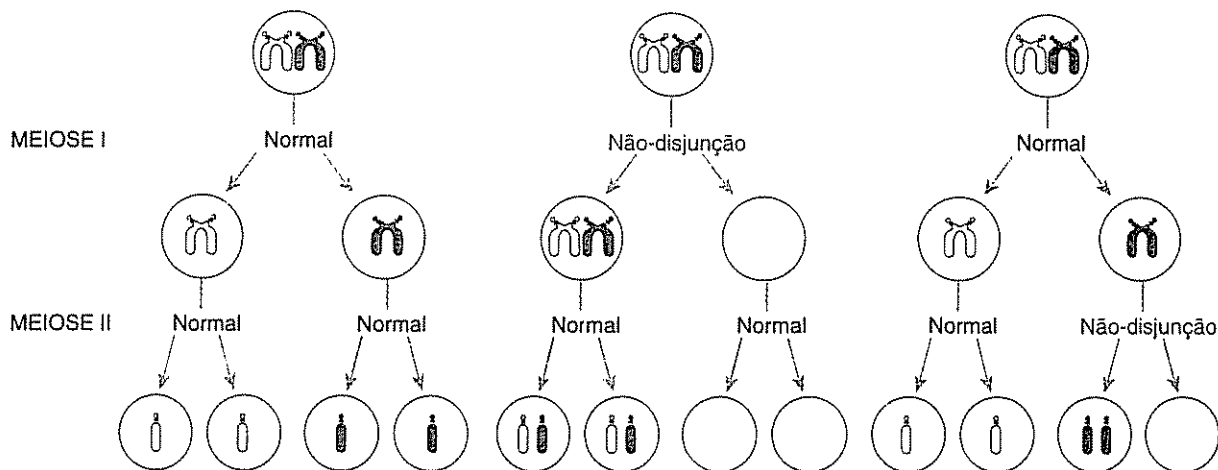



Fig. 9.7 As diferentes conseqüências da não-disjunção na meiose I (*centro*) e na meiose II (*direita*) comparadas à não-disjunção normal (*esquerda*). Se o erro ocorrer na meiose I, os gametas conterão um representante de ambos os membros do par 21 de cromossomos ou não terão nenhum cromossomo 21. Se a não-disjunção ocorrer na meiose II, os gametas anormais conterão duas cópias de um cromossomo 21 parental (e nenhuma cópia do outro) ou não terão um cromossomo 21.

na recombinação apropriada dos cromossomos, ou ambos, outros mecanismos envolvem a separação prematura das cromátides irmãs na meiose I em vez de na meiose II. Caso isto ocorra, as cromátides separadas podem por acaso se segregar para o ovócito ou para o glóbulo polar, levando a um gameta não-balanceado.

Já foram relatadas formas mais complicadas de aneuploidia múltipla. Ocasionalmente um gameta tem um representante extra de mais de um cromossomo. A não-disjunção pode ocorrer em duas divisões meióticas sucessivas ou, por acaso, simultaneamente no gameta masculino e no feminino, resultando em zigotos com números incomuns de cromossomos, que são extremamente raros exceto para os cromossomos sexuais (ver Fig. 9.5D, *encarte em cores*). A não-disjunção também pode ocorrer em uma divisão mitótica após a formação do zigoto. Se isto ocorrer em uma divisão inicial de clivagem, poderá resultar um **mosaicismo** clinicamente significativo (ver seção mais adiante). Em algumas linhagens celulares malignas e algumas culturas de células, a não-disjunção mitótica pode levar a cariótipos altamente anormais.

Um importante desenvolvimento no diagnóstico da aneuploidia, especialmente na fase pré-natal, é a aplicação de FISH multicolor em células interfásicas (ver Fig. 9.5E, *encarte em cores*). Este enfoque permite o rápido diagnóstico sem a necessidade de cultura de células. Hoje, um grande número de laboratórios de citogenética pré-natal faz análises interfásicas pré-natais para avaliar a aneuploidia dos cromossomos 13, 18, 21, X e Y, os cinco cromossomos que contribuem com a grande maioria das aneuploidias nos nativivos (ver Cap. 18).

Anomalias Cromossômicas Estruturais

Os rearranjos estruturais resultam de quebra cromossômica, seguida de reconstituição em uma combinação anormal. Os rearranjos podem ocorrer de muitos modos, que juntos são menos comuns que a aneuploidia. As anomalias estruturais estão presentes em cerca de 1 em 375 neonatos. A troca cromossômica ocorre espontaneamente em uma freqüência baixa e também pode ser induzida por agentes quebradores (clastogênicos), tais como radiação ionizante, algumas infecções virais e muitas substâncias químicas. Assim como as anomalias numéricas, os rearranjos estruturais podem estar presentes em todas as células de uma pessoa ou sob forma de mosaicos.

Os rearranjos estruturais são definidos como **balanceados**, se os conjuntos cromossômicos tiverem o complemento normal de material cromossômico, ou **não-balanceados**, se houver material adicional ou ausente. Alguns rearranjos são estáveis, capazes de passar inalterados por divisões celulares mitóticas e meióticas, enquanto outros são instáveis. Para ser estável, um cromossomo rearranjado deve ter elementos estruturais normais, incluindo um centrômero funcional e dois telômeros. Alguns destes tipos de rearranjos estruturais observados nos cromossomos humanos são ilustrados na Fig. 9.8.

Rearranjos Não-balanceados

Nos rearranjos não-balanceados, o fenótipo provavelmente é anormal em decorrência de deleção, duplicação ou (em alguns casos) ambos. A duplicação de parte de um cromossomo é comparável com a trissomia parcial. A deleção leva a uma monossomia parcial. Qualquer mudança que perturbe o balanço normal dos genes funcionais pode resultar em desenvolvimento anormal.

Uma classe importante de rearranjo não-balanceado envolve mudanças submicroscópicas que incluem telômeros de muitos cromossomos em pacientes com retardo mental idiopático. Foram detectadas pequenas deleções, duplicações e translocações em uma porcentagem significativa de tais pacientes. A análise citogenética direcionada das regiões teloméricas por FISH pode ser indicada no retardo mental inexplicado devido às profundas implicações de um resultado positivo para a consulta genética (ver Figs. 9.5F e G, *encarte em cores*).

Deleções

As deleções envolvem a perda de um segmento cromossômico, resultando em desequilíbrio cromossômico (ver Fig. 9.8A). Um portador de uma deleção cromossômica (com um homólogo normal e o outro deletado) é monossômico para a informação genética do segmento correspondente do homólogo normal. As

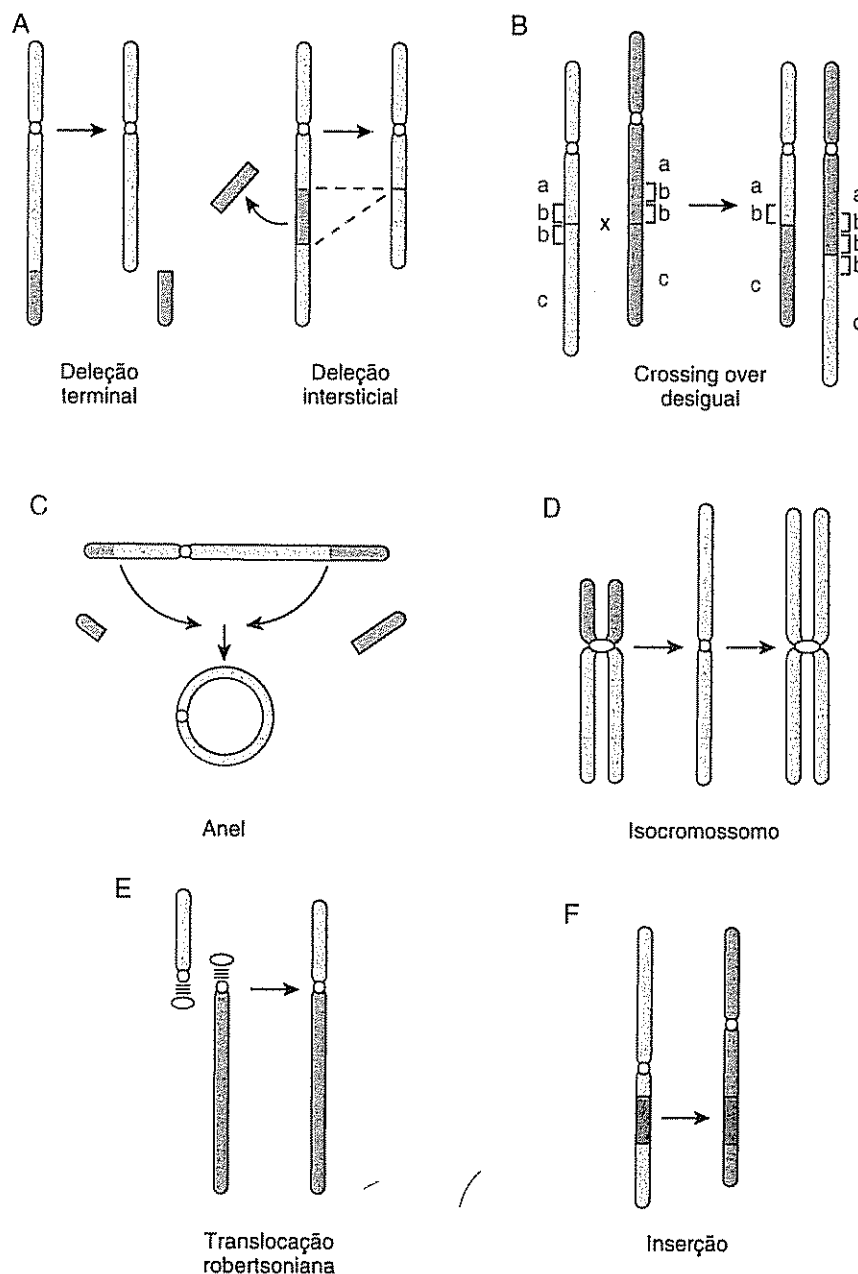



Fig. 9.8 Rearranjos estruturais de cromossomos, descritos no texto A. Deleções terminal e intersticial, cada uma gerando um fragmento acêntrico B. Crossing over desigual entre segmentos de cromossomos homólogos ou entre cromátides irmãs (segmento duplicado ou deletado indicado por colchetes) C, Cromossomo em anel com dois fragmentos acêntricos D, Geração de um isocromossomo para o braço longo de um cromossomo E. Translocação robertsoniana entre dois cromossomos acrocêntricos F. Inserção de um segmento de um cromossomo em um cromossomo homólogo

conseqüências clínicas em geral refletem a **haploinsuficiência** (literalmente, a incapacidade de uma única cópia do material genético de efetuar as funções normalmente desempenhadas pelas duas cópias) e, quando examinadas, parecem depender do tamanho do segmento deletado e do número e das funções dos genes que contêm. As deleções autossômicas citogeneticamente visíveis têm uma incidência de cerca de 1 em 7.000 nativivos.

Uma deleção pode ser terminal ou intersticial. As deleções podem se originar simplesmente de quebras cromossômicas e perda do segmento acêntrico. Alternativamente, o crossing desigual entre cromossomos homólogos malpareados ou cromátides irmãs pode ser responsável por deleções em alguns casos (ver Fig. 9.8B). As deleções também podem ser geradas por segregação anormal de uma translocação balanceada ou inversão, como descrito mais adiante. Várias deleções foram identificadas nas pesquisas de pacientes dismórficos e no diagnóstico pré-natal, mas o conhecimento da perda de genes funcionais nos segmentos deletados e sua relação com as conseqüências fenotípicas no momento ainda é limitada. Exemplos específicos destas síndromes serão discutidos no Cap. 10.

Tanto as técnicas de bandeamento de alta resolução quanto FISH podem revelar deleções que são muito pequenas para que sejam vistas em metáfases comuns. Para ser identificável citogeneticamente por bandeamento de alta resolução, uma deleção deve incluir pelo menos de 2.000 a 3.000 kb, mas deleções cariotipicamente indetectáveis com conseqüências fenotípicas podem

ser detectadas rotineiramente por FISH usando sondas específicas para a região de interesse (ver Fig. 9.5H, *encarte em cores*).

Duplicações

As duplicações, assim como as deleções, podem se originar por crossing desigual (ver Fig. 9.8B) ou por segregação anormal da meiose em um portador de uma translocação ou inversão. Em geral, a duplicação parece ser menos prejudicial que a deleção. Como a duplicação em um gameta resulta em desequilíbrio cromossômico (trissomia parcial), entretanto, e como as quebras cromossômicas que as causam podem romper genes, a duplicação em geral leva a alguma anomalia fenotípica.

Embora muitas duplicações tenham sido relatadas, poucos tipos foram estudados até o momento. Entretanto, alguns fenótipos parecem estar associados a duplicações de determinadas regiões cromossômicas.

Cromossomos Marcadores e em Anel

Cromossomos bem pequenos, não-identificados e chamados de "marcadores" são vistos ocasionalmente em preparações cromossômicas, com freqüência em estado de mosaico. Eles em geral são adicionais ao complemento cromossômico normal e, assim, também são chamados de **cromossomos supernumerários** ou **cromossomos extras estruturalmente anormais (ESACs)**. Os citogeneticistas acham os marcadores difíceis de caracterizar especificamente por bandeamento, mesmo com as técnicas de alta resolução, pois eles em geral são tão pequenos que o padrão de bandeamento é ambíguo ou não-aparente. FISH com várias sondas geralmente é necessário para uma identificação precisa. Os cromossomos marcadores pequenos em geral consistem em pouco mais que heterocromatina cêntrica, que pode ser identificada usando-se uma variedade de sondas específicas de satélites cromossômicos ou FISH "colorido". A cariotipagem espectral pode ser particularmente adequada a este fim.

Os cromossomos marcadores maiores certamente contêm algum material de um ou de ambos os braços cromossômicos, criando um desequilíbrio dos genes que estiverem presentes. A freqüência pré-natal de cromossomos marcadores supernumerários *de novo* foi estimada como sendo de cerca de 1 em 2.500. Devido ao problema da identificação, o significado clínico de um marcador é difícil de avaliar, e o achado de um marcador em um cariótipo fetal pode representar um sério problema na avaliação e na consulta genética. Dependendo da origem do marcador, o risco de uma anomalia fetal pode variar de muito baixo a tão alto quanto 100%. Uma proporção relativamente alta de tais marcadores deriva-se do cromossomo 15 e dos cromossomos sexuais. Síndromes específicas estão associadas a marcadores derivados do cromossomo 15 com dois satélites e marcadores derivados da parte central do cromossomo X (ver Cap. 10).

Uma curiosa subclasse de cromossomos marcadores não tem seqüências de DNA centromérico identificáveis, incluindo alfa satélite, a despeito de serem mitoticamente estáveis. Estes marcadores representam pequenos fragmentos de braços cromossômicos (em geral há alguma distância do centrômero normal) que de algum modo adquiriram atividade centromérica. Tais marcadores são ditos como contendo **neocentrômeros**.

Muitos cromossomos marcadores não têm seqüências teloméricas identificáveis e provavelmente são pequenos anéis. Os cromossomos em anel formam-se quando um cromossomo sofre duas quebras e as pontas do cromossomo reúnem-se em uma estrutura em anel (ver Fig. 9.8C). Os cromossomos em anel são muito raros, mas podem ser detectados para cada cromossomo humano. Se o centrômero estiver dentro do anel, espera-se que este cromossomo em anel seja mitoticamente estável. Muitos anéis têm dificuldades na mitose, entretanto, quando duas cromátides irmãs do cromossomo em anel ficam emaranhadas em sua tentativa de se separar na anáfase. Pode haver uma quebra do anel seguida de fusão, e anéis maiores e menores podem ser gerados. Em função desta instabilidade mitótica, não é comum que um cromossomo em anel seja encontrado em apenas uma proporção das células.

Isocromossomos

Um isocromossomo (ver Fig. 9.8D) é um cromossomo no qual um braço está faltando e o outro está duplicado de modo especular. Uma pessoa com 46 cromossomos que porte um isocromossomo, portanto, tem uma única cópia do material genético de um braço (monossomia parcial) e três cópias do material genético do outro braço (trissomia parcial). Uma pessoa com dois homólogos normais além do isocromossomo é tetrassômica para o braço cromossômico envolvido no isocromossomo (Fig. 9.9). Embora a base de formação do isocromossomo não seja exatamente conhecida, pelo menos dois mecanismos foram documentados: (1) má divisão do centrômero na meiose II e, mais comumente, (2) troca envolvendo um braço de um cromossomo e seu homólogo (ou cromátide irmã) na margem proximal do braço, adjacente ao centrômero. (Formalmente, estes últimos isocromossomos são isodicêntricos, embora os dois centrômeros em geral não sejam distinguíveis citogeneticamente porque estão muito próximos.)

Fig. 9.9 Identificação de um cromossomo marcador supernumerário como i(18p), um isocromossomo para o braço curto do cromossomo 18, por hibridização *in situ* com fluorescência usando uma sonda específica de DNA para o centrômero do cromossomo 18. A *seta vazada* indica o i(18p). As *setas brancas* indicam os dois cromossomos 18s normais. (Foto por cortesia de V E. Powers, Case Western Reserve University School of Medicine.)

O isocromossomo mais comum é o do braço longo do cromossomo X, i(Xq), em algumas mulheres com síndrome de Turner (ver Cap. 10). Os isocromossomos para vários autossomos já foram descritos, incluindo os isocromossomos do braço curto do cromossomo 18, i(18p) (ver Fig. 9.9) e do braço curto do cromossomo 12, i(12p). Os isocromossomos também são vistos com freqüência em cariótipos tanto de tumores sólidos quanto de malignidades hematológicas (ver Cap. 16).

Cromossomos Dicêntricos

Um dicêntrico é um tipo raro de cromossomo anormal no qual dois segmentos cromossômicos (de cromossomos diferentes ou das duas cromátides de um só), cada um com um centrômero, fundem-se de ponta a ponta, com perda de seus fragmentos acêntricos. Os dicêntricos, a despeito de seus dois centrômeros, podem ser mitoticamente estáveis se um dos dois centrômeros estiver inativo ou se os dois centrômeros sempre coordenarem seu movimento para um ou outro pólo durante a anáfase. Tais cromossomos são formalmente chamados de **pseudocêntricos**. Os pseudocêntricos mais comuns envolvem os cromossomos sexuais ou os cromossomos acrocêntricos (translocações robertsonianas; ver adiante). A avaliação do funcionamento do centrômero por FISH combinada com análise de imunofluorescência do centrômero e proteínas do cinetócoro é um procedimento especializado em alguns laboratórios de citogenética clínica (ver Fig. 9.5I, *encarte em cores*).

Rearranjos Balanceados

Os rearranjos cromossômicos em geral não têm um efeito fenotípico se estiverem balanceados, pois todo o material cromossômico está presente, muito embora esteja embalado de modo diferente. (É importante fazer aqui uma distinção entre os rearranjos verdadeiramente balanceados e aqueles que, embora pareçam citogeneticamente balanceados, estão desbalanceados em nível molecular.) Mesmo quando os rearranjos estruturais estão verdadeiramente balanceados, eles podem ser uma ameaça para a geração seguinte, pois os portadores têm a probabilidade de produzir uma alta freqüência de gametas desbalanceados e, portanto, têm um risco aumentado de ter prole anormal com cariótipos desbalanceados. Dependendo do rearranjo específico, o risco pode variar de 1% até 20%. Há também a possibilidade de que uma das quebras cromossômicas perturbe um gene, levando a uma mutação. Esta é uma causa bem documentada de doenças ligadas ao X nas mulheres portadoras de translocações balanceadas X;autossomo (ver Cap. 10), e tais translocações podem ser úteis para a localização do gene responsável por uma doença genética, como discutido no Cap. 8 no exemplo da distrofia muscular Duchenne.

Inversões

Ocorre uma inversão quando um único cromossomo sofre duas quebras e é reconstituído com o segmento entre as quebras invertido. As inversões são de dois tipos: **paracêntricas** (que não incluem o centrômero), nas quais ambas as quebras ocorrem em um só braço, e **pericêntricas** que incluem (o centrômero), nas quais há uma quebra em cada braço. Como as inversões paracêntricas não mudam a proporção entre os braços dos cromossomos, elas só podem ser identificadas por bandeamento ou FISH com sondas específicas de locus. As inversões pericêntricas são mais fáceis de identificar citogeneticamente, pois mudam a proporção dos braços cromossômicos, bem como os padrões de bandeamento.

Em geral uma inversão não causa um fenótipo anormal em seus portadores, pois é um rearranjo balanceado. Seu significado médico é para a prole. Um portador de um dos tipos de inversão corre risco de produzir gametas anormais, que podem levar a uma prole desbalanceada (Fig. 9.10). Quando uma inversão está presente, forma-se uma alça quando os cromossomos fazem o pareamento na meiose I. Embora a recombinação seja um tanto suprimida dentro das alças de inversão, quando ela ocorre, pode levar à produção de gametas desbalanceados. São formados tanto gametas com complementos cromossômicos balanceados (normais ou com uma inversão) quanto gametas com complementos desbalanceados, dependendo do local dos eventos de recombinação. Quando a inversão é paracêntrica, os cromossomos recombinantes não-balanceados são tipicamente acêntricos ou dicêntricos e podem não levar a uma prole viável (ver Fig. 9.10A), embora tenham ocorrido raras exceções. Assim, o risco de que um portador de uma inversão paracêntrica tenha um nativivo com um cariótipo anormal é de fato muito baixo.

Uma inversão pericêntrica, por outro lado, pode levar à produção de gametas não-balanceados tanto com **duplicação** como com **deficiência** de segmentos cromossômicos (ver Fig. 9.10B). Os segmentos duplicados e deficientes são os segmentos que estão distais à inversão. *O risco geral aparente de um portador de uma inversão pericêntrica produzir uma criança com um cariótipo não-balanceado é estimado como sendo de 5% a 10%.* Cada inversão pericêntrica, entretanto, está associada a um risco em particular, e as grandes inversões pericêntricas têm mais probabilidade que as menores de gerar uma prole recombinante viável, pois os segmentos não-balanceados na prole recombinante são menores no caso das grandes inversões. Três inversões bem descritas ilustram este ponto.

Uma inversão pericêntrica do cromossomo 3, que se originou em um casal de Newfoundland, casado no início da década de 1800, é uma das poucas para as quais foram obtidos dados suficientes para permitir uma estimativa da segregação do cromossomo invertido na prole dos portadores. A inv(3)(p25q21) tem sido relatada por vários centros dos EUA, em famílias cujos ancestrais foram correlacionados a províncias litorâneas do Canadá. Os portadores do cromossomo inv(3) são normais, mas alguns de sua prole têm um fenótipo anormal característico (Fig. 9.11) associado a um cromossomo 3 recombinante, no qual há uma duplicação do segmento distal a 3q21 e deficiência do segmento distal a 3p25 (ver Fig. 9.10). Nove indivíduos que eram portadores da inversão tiveram 53 gestações registradas. O alto risco empírico de um resultado anormal de uma gestação neste grupo (22/53, ou > 40%) indica a importância dos estudos de cromossomos familiares para identificar portadores e oferecer consulta genética e diagnóstico pré-natal.

Outra inversão pericêntrica associada a uma grave síndrome de duplicação/deficiência na prole recombinante envolve o cromossomo 8, inv(8)(p23.1q22.1), e é encontrada principalmente entre os hispânicos do sudoeste dos EUA. Estudos empíricos mostraram que os portadores da inv(8) têm uma chance de 6% de ter um filho com a síndrome 8 recombinante, um distúrbio letal com graves anomalias cardíacas e retardo mental. O cromossomo recombinante é duplicado para seqüências distais a 8q22.1 e deletado para seqüências distais a 8p23.1.

A inversão mais comum vista em cromossomos humanos é uma pequena inversão pericêntrica do cromossomo 9, que está

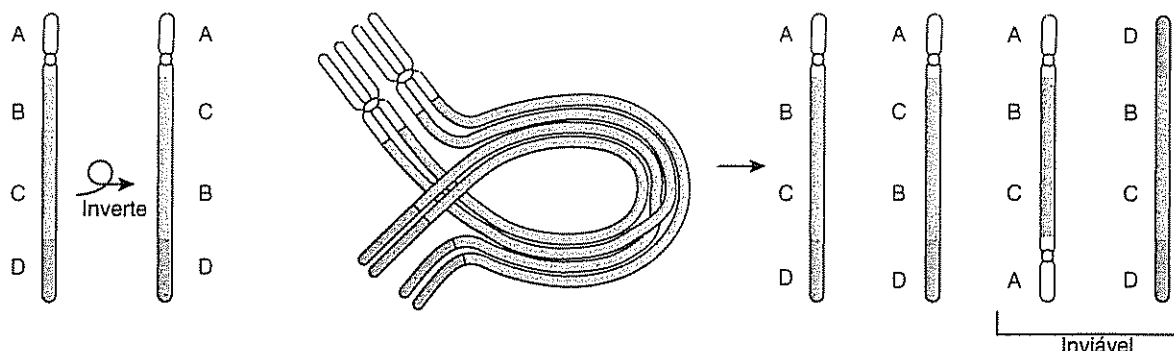
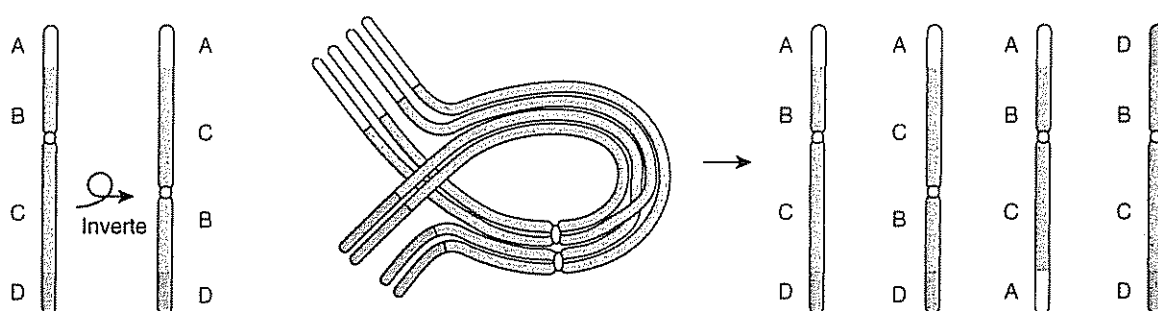



Fig. 9.10 Crossing over dentro das alças de inversão formadas na meiose I em portadores de um cromossomo com o segmento B-C invertido (ordem A-C-B-D), ao invés de A-B-C-D. A. Inversão paracêntrica. Os gametas formados após a segunda meiose em geral contêm ou a cópia normal (A-B-C-D) ou uma cópia balanceada (A-C-B-D) do cromossomo, pois os produtos acêntricos e dicêntricos do crossing são inviáveis. B. Inversão pericêntrica. Os gametas formados após a segunda meiose podem ser normais, balanceados ou não-balanceados. Os gametas não-balanceados contêm uma cópia do cromossomo com uma duplicação ou uma deficiência do material flanqueando o segmento invertido (A-B-C-A ou D-B-C-D)

presente em até 1% de todos os indivíduos testados por laboratórios de citogenética. A inv(9)(p11q12) não tem efeitos deletérios conhecidos nos portadores e não parece estar associada a um risco significativo de abortos ou prole desbalanceada. Portanto, considera-se que seja uma variante normal.

Translocações

As translocações envolvem a troca de segmentos cromossômicos entre dois cromossomos, geralmente não-homólogos. Existem três tipos principais: recíprocas, robertsonianas e inserções.

Translocações Recíprocas. Este tipo de rearranjo resulta da quebra de cromossomos não-homólogos, com troca recíproca dos segmentos quebrados. Em geral apenas dois cromossomos estão envolvidos e, como a troca é recíproca, o número total de cromossomos fica inalterado (Fig. 9.12*A*). (Translocações complexas, envolvendo três ou mais cromossomos, são raras.) As translocações recíprocas são relativamente comuns e são encontradas em cerca de 1 em 600 neonatos. Tais translocações em geral não são prejudiciais, embora sejam mais comuns em pessoas institucionalizadas com retardo mental do que na população em geral. Assim como outros rearranjos estruturais balanceados, elas estão associadas a um alto risco de gametas não-balanceados e prole anormal. Elas chamam a atenção seja durante o diagnóstico pré-natal seja quando os pais de uma criança anormal com uma translocação desbalanceada são cariotipados. É mais comum encontrar translocações balanceadas em casais

Fig. 9.11 Uma criança com um cariótipo anormal, filha de um portador de uma inversão pericêntrica. Ver o texto para discussão. (De Allderdice P.W., Browne N., Murphy D.P. [1975] Chromosome 3 duplication q21-qter, deletion p25-pter syndrome in children of carriers of a pericentric inversion inv(3)(p25q21). Am J Hum Genet 27:699-718.)

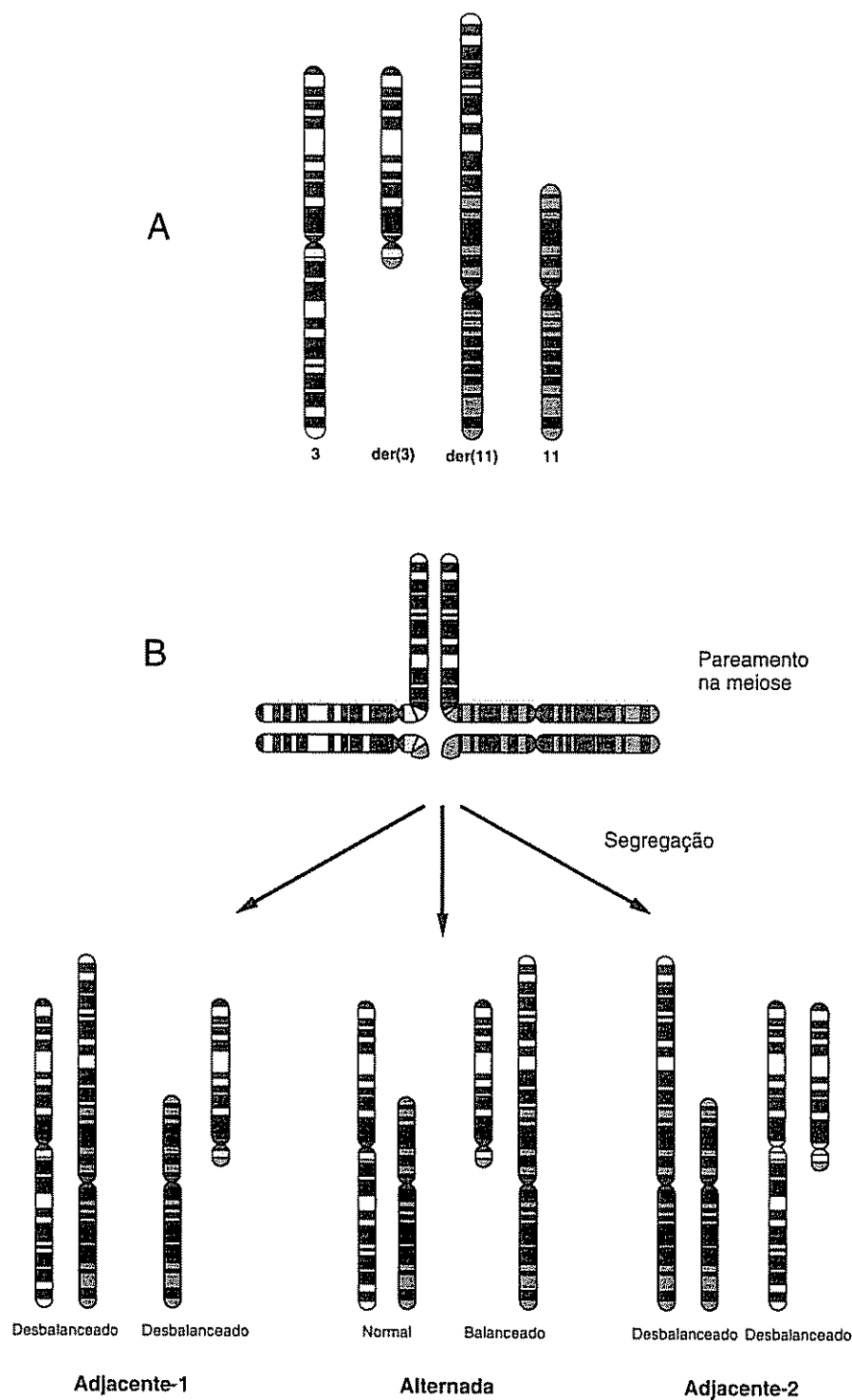



Fig. 9.12 A. Diagrama de uma translocação balanceada entre o cromossomo 3 e o cromossomo 11. t(3;11)(q12;p15.5). B. Formação quadrivalente na meiose e segregação 2:2 em um portador de t(3;11), levando a gametas balanceados ou não-balanceados. Ver texto para discussão.

que já tiveram dois ou mais abortos espontâneos e em homens inférteis do que na população em geral.

Quando os cromossomos de um portador de uma translocação recíproca balanceada formam pares na meiose, observa-se uma figura **quadrivalente** (em forma de cruz), como mostra a Fig. 9.12B. Na anáfase, os cromossomos em geral se segregam desta configuração em um dentre três modos, descritos como **segregação alternada, adjacente-1** e **adjacente-2**. A segregação alternada, o tipo usual de segregação meiótica, produz gametas que têm um complemento cromossômico normal ou os dois cromossomos recíprocos. Ambos os tipos de gametas são balanceados. Na segregação adjacente-1, os centrômeros homólogos vão para células filhas separadas, enquanto na segregação adjacente-2 (que é rara), os centrômeros homólogos passam para a mesma célula filha. Tanto a segregação adjacente-1 quanto a adjacente-2 produzem gametas desbalanceados (ver Fig. 9.12B).

Além dos exemplos mencionados de segregação 2:2 (dois cromossomos para cada pólo), os cromossomos com translocação balanceada também podem se segregar 3:1, levando a dois gametas com 22 ou 24 cromossomos. Embora a monossomia em um feto resultante seja rara, pode resultar uma trissomia. Tal segregação 3:1 é observada em 5% a 20% dos espermatozóides de portadores de translocação balanceada, dependendo da translocação específica.

Translocações Robertsonianas. Este tipo de rearranjo envolve dois cromossomos acrocêntricos que se fundem perto da região do centrômero com a perda dos braços curtos (ver Fig. 9.8E). O cariótipo balanceado resultante tem apenas 45 cromossomos, incluindo o cromossomo translocado, que, em conseqüência, é constituído dos dois braços longos de dois cromossomos. Como os braços curtos de todos os cinco pares de cromossomos acrocêntricos têm múltiplas cópias dos genes para RNA ribossômico, a perda dos braços curtos de dois cromossomos acrocêntricos não é deletéria. As translocações robertsonianas podem ser monocêntricas ou pseudocêntricas, dependendo do local do ponto de quebra em cada cromossomo acrocêntrico.

Embora translocações robertsonianas envolvendo todas as combinações de cromossomos acrocêntricos já tenham sido detectadas, duas (13q14q e 14q21q) são relativamente comuns. A translocação envolvendo 13q e 14q é encontrada em cerca de 1 pessoa em cada 1.300 e, portanto, é o rearranjo cromossômico isolado mais comum em nossa espécie.

Embora um portador de uma translocação robertsoniana seja fenotipicamente normal, há um risco de gametas não-balanceados e, portanto, de prole não-balanceada. A principal importância clínica deste tipo de translocação é que os portadores de uma translocação robertsoniana envolvendo o cromossomo 21 estão em risco de gerar um filho com síndrome de Down por translocação (ver Cap. 10).

Inserções. Uma inserção é um tipo não-recíproco de translocação que ocorre quando um segmento removido de um cromossomo é inserido em um cromossomo diferente, seja em sua orientação usual ou invertida (ver Fig. 9.8F). Como necessitam de três quebras cromossômicas, as inserções são relativamente raras. A segregação anormal em um portador de inserção pode produzir uma prole com duplicação ou deleção do segmento invertido, bem como uma prole normal e portadores balanceados. O risco médio de produzir um filho anormal é bem alto, de até 50%, e o diagnóstico pré-natal é indicado.

Mosaicismo

Quando uma pessoa tem uma anomalia cromossômica, ela em geral está presente em todas as suas células. Às vezes, entretanto, dois ou mais complementos cromossômicos diferentes estão presentes em um indivíduo. Esta situação é chamada de **mosaicismo**. O mosaicismo pode ser numérico (o tipo mais comum) ou estrutural.

Uma causa comum de mosaicismo é a não-disjunção em uma mitose pós-zigótica inicial. Por exemplo, um zigoto com um cromossomo 21 adicional pode perder o cromossomo extra em uma mitose e continuar a se desenvolver como um mosaico 46/47, +21. O significado de se encontrar o mosaicismo em geral é difícil de se avaliar, especialmente se for identificado na fase pré-natal. Os efeitos do mosaicismo no desenvolvimento variam com a época do evento de não-disjunção, a natureza da anomalia cromossômica, as proporções dos diferentes complementos cromossômicos presentes e os tecidos afetados. Um problema adicional é que as proporções dos diferentes complementos cromossômicos vistos no tecido que está sendo analisado (por exemplo, cultura de amniócitos ou linfócitos) pode não refletir necessariamente as proporções presentes em outros tecidos ou no embrião durante seus primeiros estágios de desenvolvimento. Nos estudos laboratoriais, os citogeneticistas tentam diferenciar o mosaicismo verdadeiro, presente nas pessoas, do **pseudomosaicismo**, no qual o mosaicismo provavelmente surgiu em cultura de células. A distinção nem sempre é fácil ou certa. O mosaicismo é relativamente comum nos estudos citogenéticos de culturas das vilosidades coriônicas e pode levar a grandes dificuldades de interpretação no diagnóstico pré-natal (ver Cap. 18).

Os estudos clínicos dos efeitos fenotípicos do mosaicismo têm duas fragilidades principais. Primeira, como as pessoas dificilmente são cariotipadas sem alguma indicação clínica, é raro que as pessoas mosaico clinicamente normais sejam avaliadas. Segundo, existem poucos estudos de acompanhamento de fetos mosaicos diagnosticados no período pré-natal. Entretanto, de modo geral acredita-se que as pessoas que são mosaicos para uma determinada trissomia, tais como os mosaicos para síndrome de Down ou para a síndrome de Turner, são afetadas com menos gravidade que as pessoas não-mosaico.

Incidência Populacional de Anomalias Cromossômicas

A incidência dos diferentes tipos de anomalias cromossômicas foi avaliada em vários levantamentos populacionais (Quadros 9.3 e 9.4). Os principais distúrbios numéricos dos cromossomos são três trissomias autossômicas (trissomia do 21, trissomia do 18 e trissomia do 13) e quatro tipos de aneuploidias de cromossomos sexuais: síndrome de Turner (em geral 45,X); síndrome de Klinefelter (47,XXY); 47,XYY e 47,XXX (ver Cap. 10). A triploidia e a tetraploidia contribuem com uma pequena porcentagem de casos, em particular em abortos espontâneos. A classificação e a incidência dos defeitos cromossômicos avaliadas nestes levantamentos podem ser usadas para resumir o destino de 10.000 conceptos, como apresentado no Quadro 9.5

Nativivos

A incidência geral de anomalias cromossômicas em neonatos foi vista como sendo de cerca de 1 em 160 nascimentos (0,7%). Os achados são resumidos no Quadro 9.3, classificados separadamente por anomalias numéricas específicas dos cromossomos sexuais e autossomos e por rearranjos estruturais balanceados e não-balanceados. A maioria das anomalias autossômicas pode ser diagnosticada ao nascimento, mas a maioria das anomalias de cromossomos sexuais, com exceção da síndrome de Turner, só é reconhecida clinicamente após a puberdade (ver Cap. 10). Os rearranjos balanceados raramente são identificados em termos clínicos, a menos que a pessoa portadora do rearranjo tenha um filho com um complemento cromossômico não-balanceado e estudos familiares sejam iniciados. Os rearranjos não-balanceados provavelmente chamam a atenção em termos clínicos em função dos dimorfismos e do retardo no desenvolvimento físico e mental da pessoa cromossomicamente anormal.

Abortos Espontâneos

A freqüência geral de anomalias cromossômicas nos abortos espontâneos é de pelo menos 40% a 50%, e os tipos de anomali-

QUADRO 9-3

Incidência de Anomalias Cromossômicas em Levantamentos de Neonatos

Tipo de Anomalia	Número	Incidência Aproximada
Aneuploidias dos Cromossomos Sexuais		
Homens (43.612 neonatos)		
47,XXY	45	1/1 000
47,XYY	45	1/1 000
Outras aneuploidias de X ou Y	32	1/1.350
Total masculinos	**122**	**1/360 nascimentos**
Mulheres (24 547 neonatos)		
45,X	6	1/4 000
47,XXX	27	1/900
Outras aneuploidias do X	9	1/2 700
Total	**42**	**1/580 nascimentos femininos**
Aneuploidias Autossômicas (68 159 neonatos)		
Trissomia do 21	82	1/830
Trissomia do 18	9	1/7 500
Trissomia do 13	3	1/22 700
Outras aneuploidias	2	1/34 000
Total	**96**	**1/700 nativivos**
Anomalias Estruturais (68.159 neonatos)		
(Cromossomos sexuais e autossomos)		
Rearranjos balanceados		
Robertsoniana	62	1/1 100
Outras	77	1/885
Rearranjos não-balanceados		
Robertsoniana	5	1/13 600
Outras	38	1/1 800
Total	**182**	**1/375 nativivos**
Todas as Anomalias Cromossômicas	**442**	**1/154 nativivos**

Dados de Hsu L. Y F. (1998) Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis *In* Milunsky A. (ed) Genetic Disorders and the Fetus, 4ª ed Johns Hopkins Univeristy Press, Baltimore, pp 179-248.

as diferem de vários modos daqueles vistos nos nativivos (ver Quadro 9.4). A anomalia isolada mais comum nos abortos é a 45,X (síndrome de Turner), que contribui com quase 20% dos abortos espontâneos cromossomicamente anormais, mas com menos de 1% dos nativivos cromossomicamente anormais. As outras anomalias de cromossomos sexuais, que são muito comuns em nativivos, são raras em abortos. Outra diferença é a distribuição de tipos de trissomia; por exemplo, a trissomia do 16 contribui com cerca de um terço das trissomias em abortos, mas não é vista em nenhum nativivo.

QUADRO 9-4

Freqüências de Anomalias Cromossômicas em Abortos Espontâneos com Cariótipos Anormais

Tipo	Proporção Aproximada de Cariótipos Anormais
Aneuploidia	
Trissomia autossômica	0,52
Monossomia autossômica	< 0,01
45,X	0,19
Triploidia	0,16
Tetraploidia	0,06
Outras	0,07

Baseado em análise de 8.841 abortos espontâneos não-selecionados, conforme resumido por Hsu L. Y. F (1998) Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. *In* Milunsky A. (ed) Genetic Disorders and the Fetus. 4ª ed Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 179-248

Como a taxa geral de abortos espontâneos (cerca de 15%) é conhecida, como é a incidência geral de defeitos cromossômicos específicos tanto em abortos quanto em nativivos, podemos avaliar a proporção de conceptos com um determinado cariótipo que são perdidos por aborto espontâneo (ver Quadro 9.5).

EFEITOS DO GENITOR DE ORIGEM

Imprinting Genômico

Como foi introduzido no Cap. 5, o ***imprinting* genômico** reflete a expressão diferencial dos alelos herdados materna e paternamente em um ou mais loci. Vários efeitos do genitor de origem surgiram por causa de anomalias citogenéticas e estão, portanto, incluídos neste capítulo. A evidência do *imprinting* genômico foi obtida para vários cromossomos ou regiões cromossômicas por todo o genoma, como foi revelado pela comparação dos fenótipos de indivíduos portadores da mesma anomalia citogenética afetando o homólogo materno ou o paterno (Fig. 9.13). Por exemplo, a deleção do cromossomo materno ou paterno 15q11-q13 (ver Fig. 9.5, *encarte em cores*) leva à síndrome de Angelman ou à síndrome de Prader-Willi, respectivamente, como discutido no Cap. 5.

Citogenética das Molas Hidatidiformes e Teratomas Ovarianos

Ocasionalmente, em uma gestação anormal, a placenta é convertida em uma massa de tecido que se assemelha a um cacho de

QUADRO 9–5

Resultado de 10.000 Concepções

Resultado	Concepções	Abortos Espontâneos		Nativivos
		N.º	*Porcentagem*	
Total	10.000	1.500	15	8.500
Cromossomos Normais	9.200	750	8	8.450
Cromossomos Anormais				
Total	800	750	94	50
Triploidia/tetraploidia	170	170	100	—
45,X	140	139	99	1
Trissomia do 16	112	112	100	—
Trissomia do 18	20	19	95	1
Trissomia do 21	45	35	78	10
Trissomia, outras	209	208	99,5	1
47,XXY, 47,XXX, 47,XYY	19	4	21	15
Rearranjos não-balanceados	27	23	85	4
Rearranjos balanceados	19	3	16	16
Outros	39	37	95	2

uvas, chamado de cisto em hidátide. Isto se deve a um crescimento anormal das vilosidades, nas quais o epitélio prolifera e o estroma sofre uma cavitação cística. Tal anomalia é chamada de **mola**. Uma mola pode ser completa, sem feto ou placenta normal presente, ou parcial, com restos de placenta e talvez um pequeno feto atrófico.

A **maioria das molas completas** é triplóide, com um cariótipo 46,XX. Os cromossomos são todos de origem paterna e, com raras exceções, todos os marcadores genéticos são homozigotos. Tais molas originam-se quando um único espermatozóide 23,X fertiliza um ovócito que não tem núcleo e seus cromossomos então se duplicam. A ausência de qualquer contribuição materna é tida como sendo responsável pelo desenvolvimento muito anormal, com hiperplasia do trofoblasto e tecido fetal muito desorganizado ou ausente. Cerca de metade de todos os casos de coriocarcinoma (uma malignidade de tecido fetal, não-materno) desenvolve-se de molas hidatidiformes. A condição genética recíproca é aparente em **teratomas ovarianos**, tumores benignos que surgem de células 46,XX contendo apenas cromossomos maternos. Nenhuma contribuição paterna é evidente. *Assim, o desenvolvimento fetal normal requer tanto contribuições genéticas maternas quanto paternas.* Parece que o genoma paterno é especialmente importante para o desenvolvimento extra-embrionário, enquanto o genoma materno é crucial para o desenvolvimento fetal.

Em contraste com as molas completas, as **molas parciais** são triplóides. Em cerca de dois terços dos casos, o conjunto extra de cromossomos é de origem paterna. Comparando-se casos de origem materna e paterna, percebe-se que o desenvolvimento fetal é bastante anormal em ambos, mas os defeitos são diferentes. Um conjunto paterno extra resulta em trofoblasto abundante, mas pouco desenvolvimento embrionário, enquanto um conjunto materno extra resulta em grave retardo de crescimento embrionário, com uma placenta pequena e fibrótica. A especificidade do efeito é um outro exemplo de *imprinting* genômico.

Mosaicismo Placentário Confinado

Um tipo específico de mosaicismo cromossômico ocorre quando o cariótipo da placenta é mosaico para uma anomalia, em geral uma trissomia, que não é aparente no feto. Por exemplo, a placenta pode ser 46,XX/47,XX,+15, enquanto o feto pode ser 46,XX. Esta situação, chamada de **mosaicismo placentário confinado**, pode levar a um feto fenotipicamente anormal ou nativivo, a despeito do cariótipo aparentemente euplóide. Em um mecanismo, ambas as cópias do cromossomo relevante (por exemplo, o cromossomo 15) no feto podem se originar do mesmo genitor. A interpretação é que um estado trissômico, normalmente incompatível com a sobrevida, pode ser "recuperado" pela perda de uma das cópias do cromossomo envolvido na trissomia. Por acaso, o cromossomo perdido pode ser a única cópia que se originou de um dos genitores, levando à **dissomia uniparental** nas células restantes.

O fenótipo anormal visto no feto ou nativivo pode, em muitos casos, ser explicado pela presença de genes *imprintados* no cromossomo envolvido na trissomia recuperada (ver Fig. 9.13). Por exemplo, a síndrome de Prader-Willi resultará no caso de dissomia 15 uniparental materna, enquanto a síndrome de Angelman refletirá a dissomia do 15 uniparental paterna (ver Cap. 5). Este mecanismo contribui com cerca de 30% dos casos de síndrome de Prader-Willi, mas com menos de 5% dos casos de síndrome de Angelman.

A possibilidade de mosaicismo placentário confinado é um dilema diagnóstico freqüente nos laboratórios de citogenética pré-natal (ver Cap. 18).

ESTUDOS DOS CROMOSSOMOS NA MEIOSE HUMANA

Dois enfoques gerais têm sido usados no estudo da constituição cromossômica dos espermatozóides e ovócitos de homens e mulheres, respectivamente. No primeiro enfoque, podemos analisar meioses anormais retrospectivamente, usando polimorfismos de DNA ou heteromorfismos citogenéticos para estudar a origem parental de fetos aneuplóides ou nativivos. Uma ampla análise de mais de 1.000 conceptos indicou uma contribuição significativamente diferente de não-disjunção materna ou paterna para diferentes anomalias citogenéticas. Por exemplo, a não disjunção materna contribui com mais de 90% dos casos de trissomia do 21 e 100% da trissomia do 16,

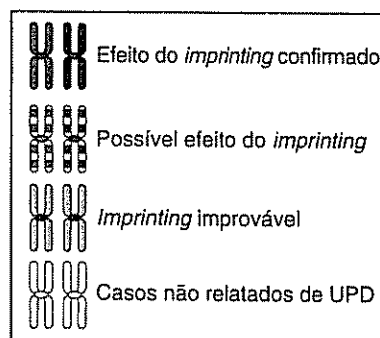
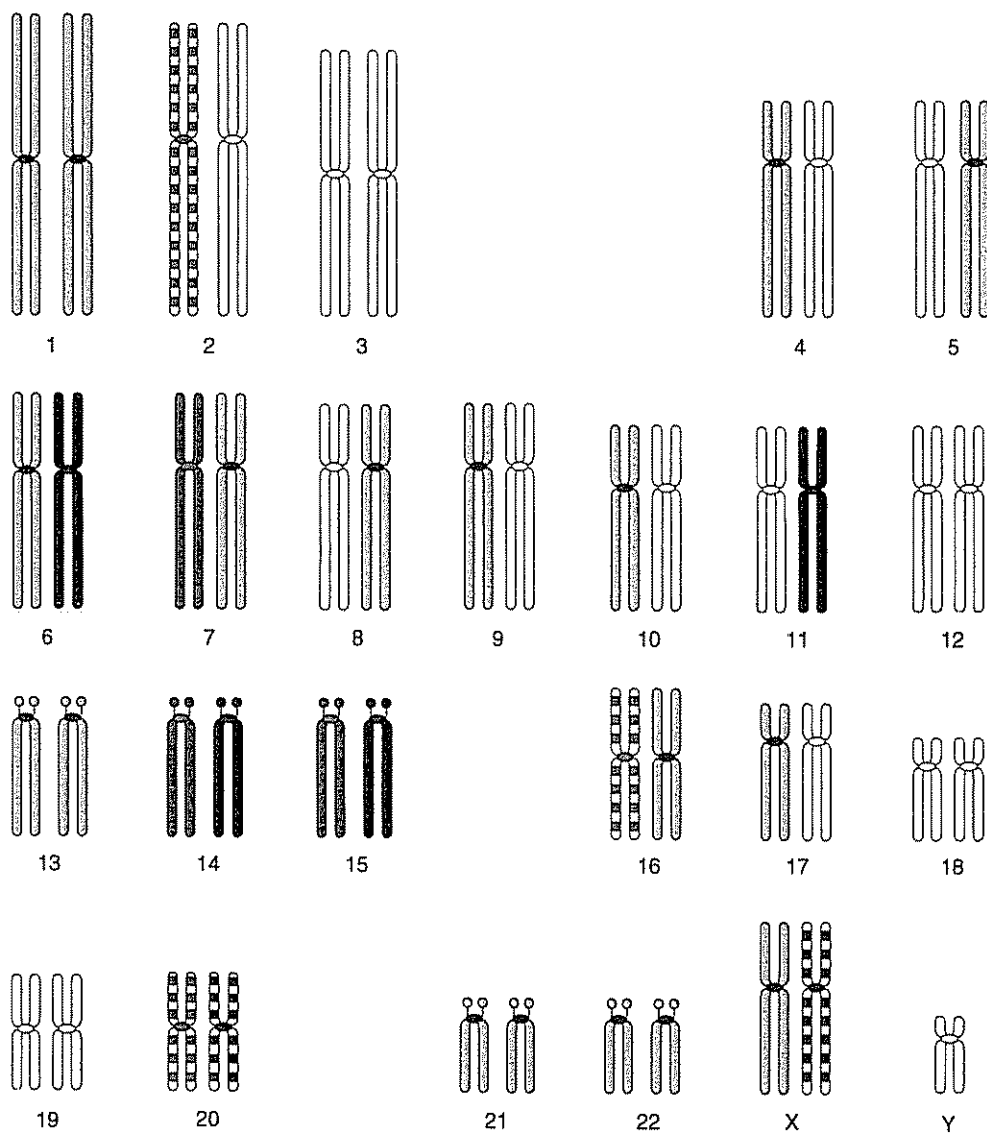



Fig. 9.13 Mapa das regiões "imprintadas" no genoma humano, com base nos fenótipos detectados em casos de dissomia uniparental envolvendo o homólogo herdado maternamente (*cromossomo da esquerda em cada par*) ou o homólogo herdado paternamente (*cromossomo da direita em cada par*) (Revisto de Ledbetter D.H . Engel E. [1995] Uniparental disomy in humans: Development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis Hum Mol Genet 4:1757-1764) (Uma versão eletrônica atualizada do mapa. com referências. está disponível em *http://www genes uchicago edu*)

mas com apenas metade dos casos de síndrome de Klinefelter (47,XXY) e apenas de 20% a 30% dos casos de síndrome de Turner (45,X).

Um enfoque secundário envolve a análise direta de cromossomos nas células germinativas humanas. Usando FISH com sondas específicas de cromossomos, um grande número de espermatozóides pode ser rapidamente avaliado quanto aos níveis de aneuploidia para cromossomos humanos individuais (ver Fig. 9.5, *encarte em cores*). Vários estudos amplos indicaram taxas específicas de cromossomos para dissomia de cerca de 1 em 1.000 a 2.000 espermatozóides, com alguma variação entre cromossomos. A não-disjunção de cromossomos sexuais parece ser muitas vezes mais freqüente que a não-disjunção dos autossomos.

Vários estudos sugeriram que a freqüência de espermatozóides cromossomicamente anormais é elevada em homens que apresentam infertilidade. Esta é uma área importante de investigação, em função do uso crescente de injeção de espermatozóides intracitoplásmica (ICSI) em seres humanos nos procedimentos de fertilização *in vitro* (IVF). Em muitos centros de IVF, a ICSI é o procedimento de escolha nos casos de infertilidade. Existem várias indicações que sugerem um grande aumento de anomalias cromossômicas (envolvendo principalmente os cromossomos sexuais) nas gestações com ICSI.

A FISH de espermatozóides também pode ser usada para avaliar a proporção de espermatozóides normais, balanceados e não-balanceados em portadores masculinos de translocações recíprocas ou inversões. Os resultados de tais estudos podem ser úteis para a consulta genética, embora a comparação dos achados em espermatozóides, fetos e nativivos deva ser feita com cautela. Por exemplo, metade dos espermatozóides em portadores de translocações recíprocas tem cariótipos não-balanceados. Isto contrasta com as observações em prole nativiva de portadores masculinos de translocação, poucos dos quais têm conjuntos cromossômicos desbalanceados.

A visualização direta dos cromossomos durante a ovocitogênese é mais difícil que durante a espermatogênese. Em conseqüência da melhoria na tecnologia de IVF, entretanto, os ovócitos podem ser obtidos na época da ovulação, amadurecidos *in vitro* e examinados por FISH durante a primeira divisão meiótica. Tais estudos estão dando esclarecimentos sobre os mecanismos de não-disjunção materna e sobre a relação entre idade materna avançada e aumento de incidência de aneuploidia.

DISTÚRBIOS MENDELIANOS COM EFEITOS CITOGENÉTICOS

Existem várias síndromes monogênicas raras, além da síndrome do X frágil, que é relativamente comum (ver Cap. 12), nas quais há uma anomalia citogenética característica (Quadro 9.6). Em termos coletivos, estes distúrbios autossômicos recessivos são chamados de **síndromes de instabilidade cromossômica**. Em cada distúrbio, um estudo cromossômico detalhado pode ser um elemento importante para o diagnóstico. A natureza do defeito cromossômico e, presumivelmente, do defeito molecular subjacente na replicação cromossômica ou reparo é diferente em cada um destes distúrbios. Por exemplo, a síndrome de Bloom é causada por um defeito em uma helicase de DNA que

QUADRO 9–6

Distúrbios Mendelianos com Efeitos Citogenéticos

Distúrbio	Herança	Características Clínicas	Efeitos Citogenéticos
Ataxia telangiectasia	AR	Ataxia cerebelar, telangiectasia, retardo do crescimento, deficiências de imunoglobulinas, predisposição à malignidade	Defeitos de reparo de DNA, dano cromatídico
Síndrome de Bloom	AR	Nanismo, exantema na face em forma de borboleta sensível ao sol, predisposição à malignidade	Alta freqüência de SCE (ver Fig. 9.14)
Anemia de Fanconi	AR	Baixa estatura, hipoplasia radial, anemia, pancitopenia, bronzeamento da pele, predisposição à leucemia	Quebra cromossômica e troca entre não-homólogos
Síndrome do X frágil	Ligada ao X	Retardo mental, macroorquidismo, orelhas grandes e mandíbula proeminente (ver Fig. 12.27)	Sítio frágil em Xq27.3 (ver Fig. 12.28)
Síndrome ICF	AR	Imunodeficiência, instabilidade centromérica, anomalias faciais	Hipometilação de seqüências específicas de DNA, associação de centrômeros dos cromossomos 1, 9 e 16
Síndrome de Roberts	AR	Retardo do crescimento, retardo do desenvolvimento, anomalias dos membros, deformações craniofaciais	Separação de regiões heterocromáticas, cromátides irmãs em forma de "trilho de ferrovia"
Xeroderma pigmentoso	AR	Sensibilidade à luz do sol, mudanças na pele, predisposição à malignidade	Defeitos de reparo por excisão, aumento da taxa de SCE após exposição à luz UV ou carcinógenos químicos

AR = autossômica recessiva; SCE = troca entre cromátides irmãs
Vários distúrbios são geneticamente heterogêneos

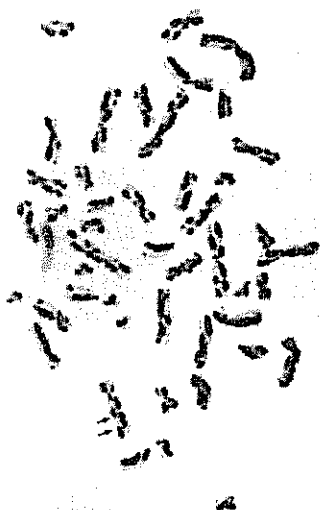



Fig. 9.14 Alta freqüência característica de trocas entre cromátides irmãs em cromossomos de um paciente com síndrome de Bloom Duas trocas são indicadas por setas (Fotomicrografia por cortesia de Chin Ho. Cytogenetics Laboratory. The Hospital for Sick Children. Toronto)

leva a um marcante aumento de recombinação somática e **troca entre cromátides irmãs** (Fig. 9.14). A síndrome ICF (caracterizada por imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais) é causada por uma deficiência em uma das metiltransferases de DNA que são necessárias para estabelecer e manter os padrões normais de metilação do DNA (nas 5-metilcitosinas; ver Cap. 10) no genoma. Os cromossomos dos pacientes com ICF apresentam uma associação anormal característica de heterocromatina pericentromérica envolvendo os cromossomos 1, 9 e 16.

Várias síndromes de quebra cromossômica citadas no Quadro 9.6 estão associadas a um risco aumentado de malignidade. A análise posterior da correlação entre a capacidade diminuída de se replicar ou reparar o DNA e o aumento do risco de malignidades deverá dar informações sobre as relações entre mutagênese e carcinogênese (ver Cap. 16).

ANÁLISE CITOGENÉTICA NO CÂNCER

Um campo importante da pesquisa do câncer é o delinear das mudanças citogenéticas em formas específicas de câncer e a relação dos pontos de quebra de vários rearranjos estruturais com os oncogenes. As mudanças citogenéticas vistas nas células cancerosas são numerosas e diversas Muitas são repetidamente vistas no mesmo tipo de tumor. Várias centenas de mudanças cromossômicas não-aleatórias, envolvendo todos os cromossomos exceto o cromossomo Y, foram identificadas em várias neoplasias. No futuro, a associação da análise citogenética com o tipo de tumor e com a efetividade da terapia será uma parte importante do tratamento de pacientes com câncer. Os tipos de mudanças cromossômicas vistos no câncer e o papel das anomalias cromossômicas na etiologia ou progresso, ou ambos, de diferentes malignidades serão mais bem discutidos no Cap. 16. Sua detecção nos laboratórios de citogenética clínica, usando FISH, pode ter um importante valor diagnóstico ou prognóstico, ou ambos, para os oncologistas (ver Fig. 9.5, *encarte em cores*).

Referências Gerais

Epstein CJ (1986) The Consequences of Chromosome Imbalance: Principles, Mechanisms, and Models Cambridge University Press, New York.

Gardner RJM, Sutherland GR (1996) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling, 2nd ed Oxford University Press, Oxford, England, 478 pp

Hsu LYF (1998) Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. *In* Milunsky A (ed) Genetic Disorders and the Fetus, 4th ed Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 179–248.

Mittleman F (ed) (1995) ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Karger, Basel, 114 pp.

Sapienza C, Hall JG (2000) Genome imprinting in human disease *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Schwartz S (1998) Molecular cytogenetics and prenatal diagnosis *In* Milunsky A (ed) Genetic Disorders and the Fetus, 4th ed Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 286–313.

Shaffer LG, Ledbetter DH, Lupski JR (2000) Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: Mechanisms and consequences of gene dosage imbalance *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York

Therman E, Susman M (1993) Human Chromosomes: Structure, Behavior, Effects, 3rd ed Springer-Verlag, New York, 376 pp.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Allderdice PW, Browne N, Murphy DP (1975) Chromosome 3 duplication q21-qter, deletion p25-pter syndrome in children of carriers of a pericentric inversion inv(3)(p25q21). Am J Hum Genet 27:699–718.

American College of Medical Genetics (1993) Prenatal interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) policy statement. Am J Hum Genet 53:526–527.

Flint J, Wilke AO, Buckle VJ, et al (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. Nature Genet 9:132–140.

Hassold TJ (1998) Nondisjunction in the human male. Curr Top Dev Biol 37:383–406

Jacobs PA, Browne C, Gregson N, et al (1992) Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. J Med Genet 29:103–108.

Ledbetter DH, Engel E (1995) Uniparental disomy in humans: Development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. Hum Mol Genet 4:1757–1764.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature 396:643–649.

Schrock E, du Manoir S, Veldman T, et al (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 273: 494–497.

Sutherland GR, Baker E, Richards RI (1998) Fragile sites still breaking. Trends Genet 14:501–506.

Warburton D (1991) De novo balanced chromosome rearrangments and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: Clinical significance and distribution of breakpoints. Am J Hum Genet 49:995–1013.

Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al (1993) Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: Clinical experience with 4500 specimens. Am J Hum Genet 52:854–865.

Problemas

1. Você mandou uma amostra de sangue de uma criança dismórfica para análise em um laboratório de citogenética. O relato do laboratório diz que o cariótipo da criança é 46,XY,18q−.
   (a) O que este cariótipo significa?
   (b) O laboratório pede amostras de sangue dos genitores clinicamente normais para análise. Por quê?
   (c) O laboratório declara que o cariótipo da mãe é 46,XX e que o cariótipo do pai é 46,XY,−7,−18,+t(7;18)(q35;q12). O que o último cariótipo significa? Com relação aos ideogramas cromossômicos normais da Fig. 9.1, desenhe o cromossomo ou cromossomos translocados no pai e em seu filho. Desenhe estes cromossomos na meiose do pai. Que tipos de gametas ele pode produzir?
   (d) À luz desta nova informação, o que o cariótipo da criança significa agora? Que regiões são monossômicas? E trissômicas? Em vista das informações do Cap. 3, avalie o número de genes presentes nas regiões trissômica ou monossômica.
2. Um feto espontaneamente abortado apresenta trissomia do 18.
   (a) Que proporção de fetos com trissomia do 18 perde-se por aborto espontâneo?
   (b) Qual o risco de que os genitores tenham um filho nativivo com trissomia do 18 em uma futura gestação?
3. Um neonato com síndrome de Down, quando cariotipado, apresenta-se com duas linhagens celulares: 70% de suas células têm o cariótipo típico 47,XX,+21 e 30% são normais 46,XX. Quando provavelmente ocorreu a não-disjunção? Qual o prognóstico para esta criança?
4. Quais das pessoas que se seguem são ou espera-se que sejam fenotipicamente normais?
   (a) Uma mulher com 47 cromossomos, incluindo um pequeno cromossomo supernumerário derivado da região centromérica do cromossomo 15.
   (b) Uma mulher com o cariótipo 47,XX,+13.
   (c) Um homem com deleção de uma banda no cromossomo 4.
   (d) Uma pessoa com uma translocação recíproca balanceada.
   (e) Uma pessoa com inversão pericêntrica do cromossomo 6.
   Que tipos de gametas cada uma destas pessoas produz? Que tipos de prole podem resultar, supondo-se que o outro genitor seja cromossomicamente normal?
5. Para cada uma das situações que se seguem, diga se a análise cromossômica é indicada ou não. Para quais membros da família, se é que algum? Para que tipo de anomalia cromossômica a família de cada caso correria risco?
   (a) Uma mulher grávida de 29 anos de idade e seu marido de 41 anos, sem história de defeitos genéticos.
   (b) Uma mulher grávida de 41 anos de idade e seu marido de 29 anos, sem história de defeitos genéticos.
   (c) Um casal cujo único filho tem síndrome de Down.
   (d) Um casal cujo único filho tem distrofia muscular Duchenne.
   (e) Um casal que tem dois meninos gravemente retardados.

Citogenética Clínica: Distúrbios dos Autossomos e dos Cromossomos Sexuais

No Cap. 9 introduzimos os princípios gerais da citogenética clínica e os diferentes tipos de anomalias detectadas na prática clínica. Neste capítulo apresentamos um relato mais detalhado de vários distúrbios cromossômicos específicos e suas causas e conseqüências. Primeiro discutimos as anomalias autossômicas mais comuns, incluindo a síndrome de Down, seguida da consideração dos cromossomos X e Y, sua biologia única e suas anomalias. Como a definição do sexo é determinada cromossomicamente, incluímos nesta discussão os distúrbios do desenvolvimento das gônadas e da diferenciação sexual. Muito embora muitos destes distúrbios sejam determinados monogenicamente, um enfoque clínico para avaliar uma genitália ambígua em geral inclui uma análise citogenética detalhada.

DISTÚRBIOS AUTOSSÔMICOS

Nesta seção estão descritos os principais distúrbios autossômicos de significado clínico. Embora existam vários distúrbios cromossômicos raros, nos quais o ganho ou a perda de um cromossomo inteiro ou de um segmento cromossômico tenha sido relatado, muitos deles ou só foram vistos em fetos que foram abortados espontaneamente ou envolvem segmentos cromossômicos relativamente pequenos. Existem apenas três distúrbios cromossômicos bem-determinados, sem mosaicismo e compatíveis com a sobrevida pós-natal nos quais há uma trissomia de um autossomo inteiro: a **trissomia do 21** (síndrome de Down), a **trissomia do 18** e a **trissomia do 13**.

Cada uma destas trissomias autossômicas está associada a retardo de crescimento, retardo mental e múltiplas anomalias congênitas. Entretanto, cada um tem um fenótipo distinto. As anomalias de desenvolvimento características de algum estado trissômico são determinadas pela dosagem extra de determinados genes no cromossomo adicional. Hoje, o conhecimento da relação específica entre o cromossomo extra e a anomalia desenvolvimental conseqüente ainda é limitado. As atuais pesquisas, entretanto, estão começando a mostrar que genes específicos no cromossomo extra são responsáveis, por modulação direta e indireta das vias de desenvolvimento, por aspectos específicos do fenótipo anormal. De modo mais geral, espera-se que qualquer desequilíbrio cromossômico que envolva a adição ou a perda de genes tenha um efeito fenotípico determinado pela dosagem de genes específicos no segmento cromossômico extra ou ausente.

Síndrome de Down

A síndrome de Down, ou trissomia do 21, é de longe o mais comum e mais bem conhecido dos distúrbios cromossômicos e a causa genética isolada mais comum de retardo mental moderado. Cerca de 1 criança em 800 nasce com síndrome de Down (ver Quadro 9.3), e entre os nativivos ou fetos de mães com 35 ou mais anos de idade a taxa de incidência é bem mais alta (Quadro 10.1).

A síndrome foi descrita clinicamente pela primeira vez por Langdon Down em 1866, mas sua causa permaneceu um profundo mistério por quase um século. Duas características notáveis de sua distribuição populacional chamaram a atenção: o aumento da idade materna e uma distribuição peculiar dentro das famílias — a concordância em gêmeos monozigóticos, mas a quase total discordância em gêmeos dizigóticos e outros membros da família. Embora desde a década de 1930 já se reconhecesse que uma anomalia cromossômica poderia explicar estas observações, nessa época ninguém estava preparado para acreditar que os seres humanos fossem de fato sujeitos a anomalias cromossômicas. Entretanto, quando as técnicas para análise detalhada de cromossomos humanos tornou-se disponível, a síndrome de Down foi uma das primeiras condições a ser examinada cromossomicamente. Em 1959 foi estabelecido que a maioria das crianças com síndrome de Down tinha 47 cromossomos, sendo o membro extra um pequeno cromossomo acrocêntrico que desde então foi designado cromossomo 21 (ver Fig. 9.6).

Fenótipo

A síndrome de Down em geral pode ser diagnosticada ao nascimento ou logo após por suas características dismórficas, que

QUADRO 10–1

Incidência de Síndrome de Down em Nativivos e Fetos em Relação à Idade Materna

	Incidência		
Idade Materna (Anos)	*Ao Nascimento*	*Na Amniocentese (16 semanas)*	*Na Punção de Vilosidades Coriônicas (9-11semanas)*
15-19	1/1 250	—	—
20-24	1/1.400	—	—
25-29	1/1.100	—	—
30	1/900	—	—
31	1/900	—	—
32	1/750	—	—
33	1/625	1/420	1/370
34	1/500	1/333	1/250
35	1/385	1/250	1/250
36	1/300	1/200	1/175
37	1/225	1/150	1/175
38	1/175	1/115	1/115
39	1/140	1/90	1/90
40	1/100	1/70	1/80
41	1/80	1/50	1/50
42	1/65	1/40	1/30
43	1/50	1/30	1/25
44	1/40	1/25	1/25
45 ou mais	1/25	1/20	1/15

Dados de Hsu (1998) e Gardner e Sutherland (1996). Os dados foram arredondados e são aproximados.

variam entre os pacientes mas sempre produzem um fenótipo característico (Fig 10.1). A hipotonia pode ser a primeira anomalia notada nos neonatos. Além das características faciais dismórficas evidentes mesmo para o observador não-treinado, os pacientes têm baixa estatura e braquicefalia com occipúcio achatado. O pescoço é curto, com pele frouxa na nuca. A ponte nasal é achatada, as orelhas têm implantação baixa e um aspecto dobrado característico, os olhos têm manchas de Brushfield ao redor da margem da íris e a boca fica aberta, mostrando uma língua grande e cheia de sulcos. As pregas epicânticas e as fendas palpebrais elevadas deram origem ao termo "mongolismo", antes usado para designar esta condição (hoje o termo é considerado impróprio e não deve ser usado). As mãos são curtas e largas, em geral com uma única prega palmar transversa ("linha simiesca") e o quinto dedo encurvado, ou clinodactilia (Fig. 10.2). Os dermatóglifos (padrões de cristas dérmicas) são altamente característicos. Os pés mostram um grande espaço entre o primeiro e segundo artelhos, com um sulco que se estende proximalmente na superfície plantar.

A principal causa de preocupação na síndrome de Down é o retardo mental. Muito embora no início da lactância a criança possa não apresentar um retardo de desenvolvimento, ele é óbvio ao final do primeiro ano. O quociente de inteligência (QI) em geral é de 30 a 60 quando a criança está suficientemente desenvolvida para ser testada. Entretanto, muitas crianças com síndrome de Down desenvolvem-se em pessoas alegres, responsivas e mesmo autoconfiantes, a despeito destas limitações (ver Fig. 10.1).

Fig. 10.1 Duas crianças com síndrome de Down. (A, Cortesia de David Patterson, Eleanor Roosevelt Institute, Denver. B, De Jones K L [1988] Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation, 4ª ed. WB Saunders, Philadelphia.)

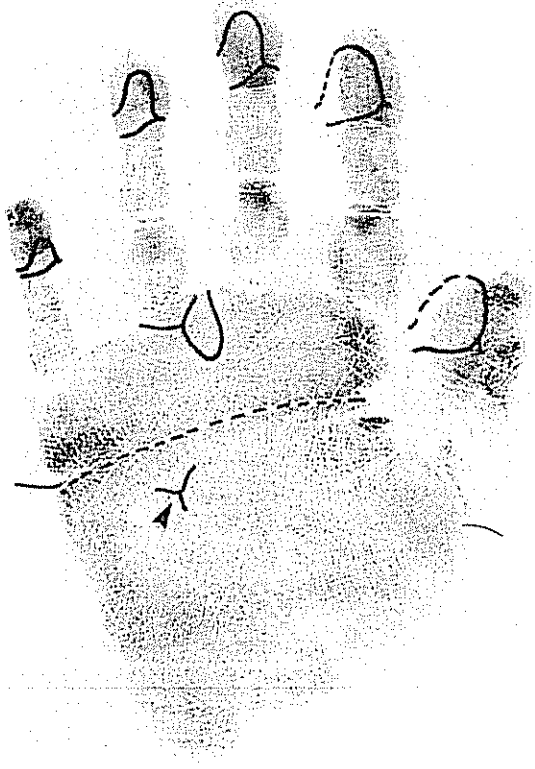



Fig. 10.2 Cristas dérmicas características da palma de uma criança com síndrome de Down: linha única de flexão (linha simiesca), trirrádio axial (*seta*) em posição distal, uma área padrão na palma entre o terceiro e quarto dedos e alças ulnárias nos dez dedos

A doença cardíaca congênita está presente em pelo menos um terço de todos os nativivos com síndrome de Down e em uma proporção um pouco maior de abortos com a síndrome. Algumas malformações, tais como atresia duodenal e fístula traqueoesofagiana, são mais comuns na síndrome de Down que em outros distúrbios. Há um aumento de 15 vezes no risco de leucemia.

Sobrevida Pré- e Pós-natal

Como a trissomia do 21 é responsável por cerca de metade de todas as anomalias identificadas na fase pré-natal, a incidência de síndrome de Down vista em nativivos, na amniocentese e nas amostras de vilosidades coriônicas em diferentes idades maternas pode dar uma base para se avaliar a quantidade de perda fetal entre a 11.ª e 16.ª semanas e entre a 16.ª semana e o nascimento (ver Quadro 10.1). Em todas as idades maternas mostradas, há alguma perda entre a 11.ª e 16.ª semanas (como se poderia esperar pela alta taxa de anomalias cromossômicas vistas nos abortos espontâneos) e uma perda adicional mais tarde na gestação. Na verdade, provavelmente apenas de 20% a 25% dos conceptos com trissomia do 21 sobrevivem até o nascimento (ver Quadro 9.5).

Entre os conceptos com síndrome de Down, os que têm menos chance de sobreviver são aqueles com doença cardíaca congênita; cerca de um quarto das crianças nativivas com defeitos cardíacos morre antes do primeiro aniversário. A senilidade prematura, associada a achados neuropatológicos característicos da doença de Alzheimer (atrofia cortical, dilatação ventricular e emaranhados neurofibrilares), afeta os pacientes com síndrome de Down várias décadas antes da idade típica de início da doença de Alzheimer na população em geral.

Os Cromossomos na Síndrome de Down

O diagnóstico clínico na síndrome de Down em geral não apresenta nenhuma dificuldade em particular. Entretanto, a cariotipagem é necessária para a confirmação e para dar uma base para a consulta genética. Embora o cariótipo específico responsável pela síndrome de Down em geral tenha pouco efeito no fenótipo do paciente, ele é essencial para se determinar o risco de recorrência.

Trissomia do 21. Em cerca de 95% de todos os pacientes, a síndrome de Down envolve a trissomia para o cromossomo 21 (ver Fig. 9.6), resultando da não-disjunção meiótica do par de cromossomos 21, como foi discutido no capítulo anterior. Como se observou antes, o risco de ter um filho com a trissomia do 21 aumenta com a idade materna, especialmente após os 30 anos de idade (ver Quadro 10.1). O erro meiótico responsável pela trissomia em geral ocorre durante a meiose materna (cerca de 90% dos casos), predominantemente na meiose I, mas pode ocorrer na meiose paterna (cerca de 10% dos casos), em geral na meiose II.

Translocação Robertsoniana. Cerca de 4% dos pacientes com síndrome de Down têm 46 cromossomos, um dos quais tem uma translocação robertsoniana entre o cromossomo 21q e o braço longo de um dos outros cromossomos acrocêntricos (em geral o cromossomo 14 ou 22). O cromossomo translocado substitui um dos acrocêntricos normais, e o cariótipo do paciente com síndrome de Down com uma translocação robertsoniana entre os cromossomos 14 e 21 é, portanto, 46,XX ou XY,rob(14;21),+21. A nomenclatura padrão é escrita rob (14;21), e não t(14;21), para indicar este tipo especial de translocação. De fato, o paciente é trissômico para 21q.

Ao contrário da trissomia do 21 padrão, a síndrome de Down por translocação não mostra relação com a idade materna, mas tem um risco de recorrência relativamente alto nas famílias quando um genitor, em especial a mãe, é portadora da translocação. Por este motivo, a caritopagem dos genitores — e possivelmente de outros parentes — é necessária antes que seja dada uma consulta genética precisa.

Um portador de uma translocação robertsoniana que envolva os cromossomos 14 e 21 tem apenas 45 cromossomos; um cromossomo 14 e um cromossomo 21 estão faltando e são substituídos pelo cromossomo translocado. Portanto, o cariótipo é 45,XX ou XY,rob(14;21). Os gametas que podem ser formados por tal portador são mostrados na Fig. 10.3. Teoricamente, existem seis tipos possíveis de gametas, mas três deles parecem incapazes de levar a uma prole viável. Dos três tipos viáveis, um é normal, um é balanceado e um é não-balanceado, tendo tanto o cromossomo da translocação quanto o cromossomo 21 normal. Em combinação com um gameta normal, isto pode produzir uma criança com síndrome de Down por translocação (Fig. 10.4). Teoricamente, os três tipos de gametas são produzidos em números iguais e, portanto, o risco teórico de uma criança com síndrome de Down deveria ser de 1 em 3. Entretanto, amplos estudos populacionais mostraram que os complementos cromossômicos não-balanceados aparecem em apenas cerca de 10% a 15% da prole de mães portadoras e em apenas alguns poucos por cento da

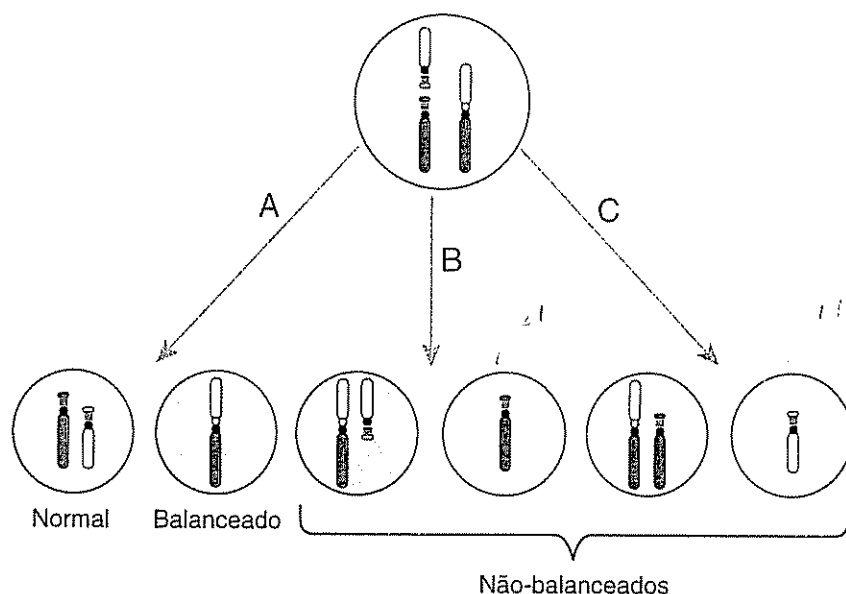



Fig. 10.3 Os cromossomos dos gametas que teoricamente podem ser produzidos por um portador de uma translocação robertsoniana, rob(14;21) A. Complementos normal e balanceado B. Não-balanceados, um produto com o cromossomo translocado e o cromossomo 21 normal, o produto recíproco apenas com o cromossomo 14 C. Não-balanceados, um produto com o cromossomo translocado e o cromossomo 14, e o produto recíproco apenas com o 21 Apenas os três gametas sobre o fundo sombreado à esquerda podem levar a uma prole viável Ver texto para uma descrição do destino eventual destes gametas

prole de pais portadores que têm translocações envolvendo o cromossomo 21.

Translocação 21q21q. Um cromossomo com translocação 21q21q é um cromossomo constituído de dois braços longos do cromossomo 21. Ele é visto em uma pequena proporção de pacientes com síndrome de Down. Acredita-se que se origine como um isocromossomo, e não por translocação robertsoniana. Embora esta seja uma anomalia rara, ela é particularmente importante porque todos os gametas de um portador de tal cromossomo devem conter ou o cromossomo 21q21q, com sua dose dupla de material genético do cromossomo 21, ou não ter e não apresentar nenhum representante do cromossomo 21. A prole potencial, portanto, inevitavelmente tem ou síndrome de Down ou monossomia do 21, que raramente é viável. Em outras palavras, uma pessoa que tenha a falta de sorte de ter um cromossomo 21q21q será incapaz de ter filhos normais e só terá filhos com síndrome de Down.

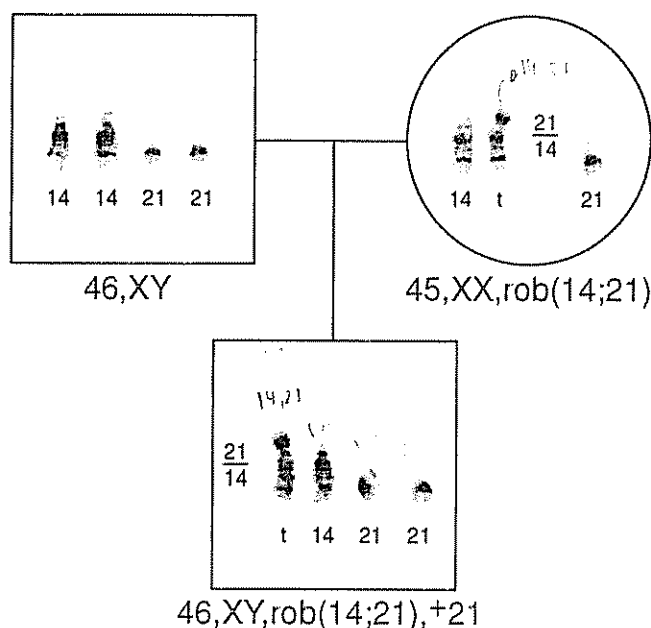



Fig. 10.4 Translocação 14q21q transmitida por uma mãe portadora a seu filho, que tem síndrome de Down Os cromossomos do pai são normais Apenas os cromossomos 14, 21 e rob(14;21) são mostrados t = rob(14;21) (Cariótipo original por cortesia de R G Worton, The Hospital for Sick Children, Toronto)

Mosaicismo de Síndrome de Down. Uma pequena porcentagem de pacientes com síndrome de Down é mosaico, em geral para populações de células com um cariótipo normal ou com trissomia do 21. O fenótipo pode ser mais brando que o da trissomia típica do 21, mas há uma ampla variabilidade de fenótipos entre os pacientes mosaicos, o que possivelmente reflete a proporção variável de células com trissomia do 21 no embrião durante o início do desenvolvimento. O paciente detectado com mosaicismo de síndrome de Down provavelmente representa os casos mais graves em termos clínicos, pois as pessoas afetadas de modo brando têm menos chance de ser cariotipadas.

Trissomia Parcial do 21. Muito raramente a síndrome de Down é diagnosticada em um paciente no qual apenas uma parte do braço longo do cromossomo 21 está presente em triplicata, e identificar um paciente com síndrome de Down sem anomalia citogenética visível é ainda mais raro. Estes pacientes são de particular interesse porque podem mostrar que região do cromossomo 21 provavelmente é responsável por componentes específicos do fenótipo da síndrome de Down e que regiões podem ser triplicadas sem causar este aspecto do fenótipo.

Embora as informações do Projeto do Genoma Humano (ver Cap. 8) tenham demonstrado que o cromossomo 21 contém ape-

nas algumas centenas de genes, as tentativas de correlacionar a dosagem tripla de genes com os aspectos específicos da síndrome de Down até agora não tiveram sucesso. A separação dos genes cruciais para a expressão da síndrome de Down daqueles que são apenas sintênicos a eles no cromossomo 21 é um foco de investigação atual, usando especialmente o camundongo como modelo substituto. Os camundongos produzidos para conter dosagem extra de genes do cromossomo humano 21 podem mostrar anomalias fenotípicas.

Etiologia da Trissomia do 21

Embora a base cromossômica da síndrome de Down seja clara, o motivo da anomalia cromossômica ainda é pouco compreendido. A alta porcentagem de todos os casos de trissomia do 21 nos quais se originaram os gametas anormais durante a meiose I materna sugere algo sobre a meiose I materna, relacionado ao aumento de idade materna, como sendo a causa subjacente. Uma possibilidade óbvia é o modelo do "ovócito antigo": sugeriu-se que quanto mais antigo for o ovócito, maior será a chance de que os cromossomos não se disjuntem corretamente. Como já foi mencionado, as análises de trissomias do 21 (bem como de outras trissomias autossômicas) implicaram o número e/ou o local dos eventos de recombinação como um determinante de se o par cromossômico irá se disjuntar corretamente durante as duas divisões meióticas. Os ovócitos mais antigos podem ser menos capazes de superar uma suscetibilidade à não-disjunção estabelecida pela maquinaria de recombinação. Uma característica marcante deste modelo (e que complica muito sua investigação) é que o evento etiológico que leva ao nascimento de uma criança com síndrome de Down hoje pode ter ocorrido há 35 a 40 anos, quando a mãe da criança ainda era um feto, cujos ovócitos primários estavam em prófase da primeira divisão de meiose. A despeito do reconhecimento da importante associação entre os padrões de recombinação e a segregação cromossômica, a compreensão total da não-disjunção do cromossomo 21 e do efeito da idade materna continuam obscuros.

Risco de Síndrome de Down

Um problema freqüente na consulta genética, em especial na genética pré-natal, é como avaliar o risco de nascimento de uma criança com síndrome de Down. A síndrome de Down pode ser detectada na fase pré-natal por análise citogenética de vilosidades coriônicas ou células do líquido amniótico e, de fato, cerca de 80% dos diagnósticos pré-natais são feitos porque a idade materna avançada ou a triagem bioquímica pré-natal geraram preocupação quanto ao risco de síndrome de Down no feto. Uma orientação comumente aceita é que a mulher seja elegível para diagnóstico pré-natal se o risco de seu feto ter síndrome de Down superar o risco do procedimento de amniocentese ou punção de vilosidades coriônicas usados para obter tecido fetal para análise cromossômica levar a uma perda fetal (ver Cap. 18). O risco depende principalmente da idade materna, mas também dos cariótipos dos genitores.

A incidência populacional de síndrome de Down em nativivos é estimada atualmente como sendo de cerca de 1 em 800, refletindo a distribuição da idade materna para todos os nascimentos e a proporção de mães com mais idade que usam o diagnóstico pré-natal e o término seletivo. Por volta dos 30 anos, o risco começa a aumentar muito, atingindo 1 em 25 nascimentos no grupo etário com mais idade (ver Quadro 10.1). Muito embora as mães mais jovens tenham um risco muito mais baixo, sua taxa de nascimento é tão mais alta que mais da metade das mães de todas as crianças com síndrome de Down têm menos de 35 anos. O risco de síndrome de Down devido à translocação ou trissomia parcial não está relacionado à idade materna. A idade paterna parece não ter muita influência no risco.

Nos EUA e no Canadá, 50% ou mais das mulheres grávidas com 35 anos de idade ou mais submetem-se a diagnóstico pré-natal quanto à análise de cromossomos, mas em apenas 1% dos fetos testados encontra-se a trissomia do 21. Os enfoques atuais para identificação mais precisa ou eficiente de fetos em risco, por meio de tiragens bioquímicas e ultra-sonografia, serão discutidos no Cap. 18. Métodos para examinar as raras células fetais na circulação materna também estão sendo desenvolvidos.

Risco de Recorrência

O risco de recorrência da trissomia do 21 ou de alguma outra trissomia autossômica, após o nascimento de uma criança portadora de trissomia em uma família, é de cerca de 1%. Para mães com menos de 30 anos, o risco é de cerca de 1,4%, e para mães mais velhas é o mesmo que o risco relacionado à idade; isto é, há um aumento do risco para as mães mais jovens, mas apenas o risco relativo à idade para as mães com mais idade. O motivo do aumento do risco para as mães jovens não é conhecido. Uma possibilidade é que o mosaicismo não-reconhecido de linhagem germinativa em um genitor, com uma linhagem celular trissômica bem como uma linhagem normal, possa ser um fator. Uma história de trissomia do 21 em outra parte da família, embora em geral cause ansiedade materna, não parece aumentar significativamente o risco de ter um filho com síndrome de Down.

O risco de recorrência para a síndrome de Down devido a uma translocação é muito maior, como descrito anteriormente.

Trissomia do 18

O fenótipo de uma criança com trissomia do 18 é mostrado na Fig. 10.5. As características da trissomia do 18 sempre incluem retardo mental e falta de desenvolvimento e, em geral, incluem várias malformações do coração. A hipertonia é um achado típico. A cabeça tem um occipúcio proeminente e mandíbula retraída. As orelhas têm implantação baixa e são malformadas. O esterno é curto. As mãos ficam cerradas de modo característico, com o segundo e quinto dedos se superpondo ao terceiro e ao quarto (ver Fig. 10.5). Os pés têm um aspecto de "pé de cadeira de balanço", com o calcanhar proeminente. Os padrões dérmicos são distintos, com sulcos únicos nas palmas e padrões de arco na maioria dos dedos. As unhas em geral são hipoplásicas.

A incidência desta condição em nativivos é de cerca de 1 em 7.500 nativivos (ver Quadro 9.3). A incidência na concepção é muito maior, mas cerca de 95% dos conceptos com trissomia do 18 são abortados espontaneamente. A sobrevida pós-natal também é pobre, e a sobrevida por mais de alguns meses é rara. Cerca de 80% dos pacientes são femininos, talvez devido à sua sobrevivência preferencial. Como na maioria das outras trissomias, o aumento da idade materna é um fator, e o risco de uma criança com trissomia do 18 é substancialmente maior para mulheres com mais de 35 anos.

O fenótipo da trissomia do 18, como o da trissomia do 21, pode resultar de uma variedade de cariótipos raros que não a trissomia completa, e a cariotipagem de crianças ou fetos afetados é essencial. Em cerca de 20% dos casos, há uma translocação envolvendo todo o cromossomo 18 ou a maior parte dele, que pode ser *de novo* ou herdada de um genitor portador balanceado. A

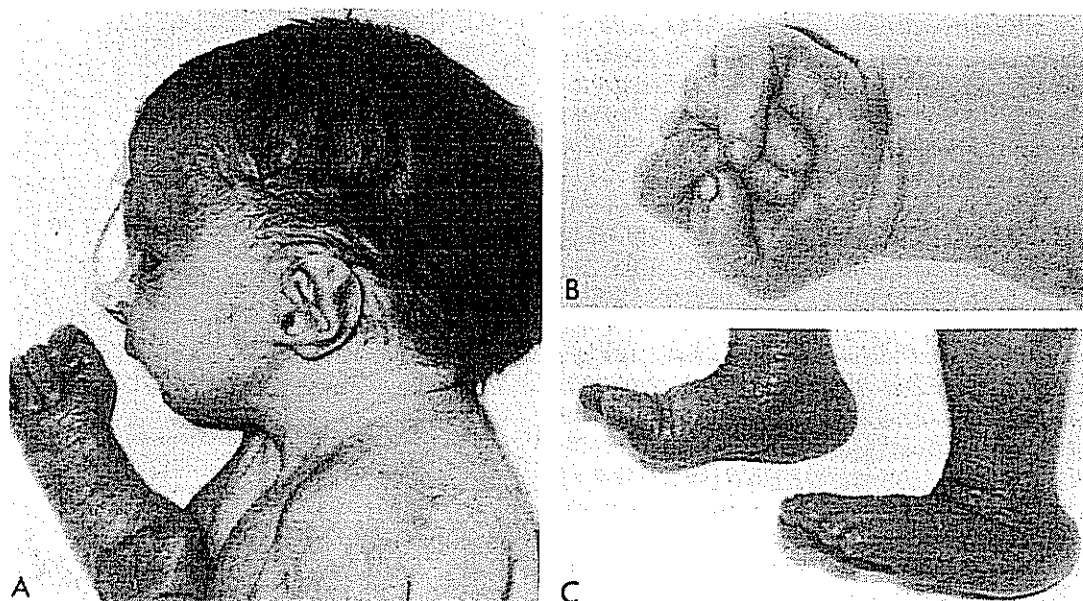



Fig. 10.5 Uma criança com trissomia do 18 Notar a mão cerrada com o segundo e quinto dedos superpondo-se ao terceiro e ao quarto; pés em cadeira de balanço com calcanhares proeminentes e orelhas malformadas e de implantação baixa (Cortesia do Dr H Medovy, Children's Centre, Winnipeg, Canadá)

trissomia também pode estar presente sob a forma de mosaico, com expressão variável, mas em geral um pouco mais branda.

Trissomia do 13

O fenótipo marcante da trissomia do 13 é mostrado na Fig. 10.6. Estão presentes retardo de crescimento e um grave retardo mental, acompanhados de graves malformações do sistema nervoso central, tais como arrinencefalia e holoprosencefalia. A testa é inclinada, há microcefalia e largas suturas, podendo haver microftalmia, coloboma de íris ou mesmo ausência dos olhos. As orelhas são malformadas. Em geral estão presentes as fendas labial e palatina. As mãos e os pés podem apresentar polidactilia pós-axial, e as mãos ficam cerradas com o segundo e quinto dedos se superpondo ao terceiro e ao quarto, como na trissomia do 18. Os pés, novamente como na trissomia do 18, têm um aspecto de pé de cadeira de balanço. As palmas com freqüência têm linhas simiescas. Internamente, em geral há defeitos cardíacos congênitos de tipos específicos e defeitos urogenitais, incluindo criptorquidismo nos homens, útero bicórneo e ovários hipoplásicos nas mulheres, e rins policísticos. Desta constelação de defeitos, os mais claros são o aspecto facial geral com fendas labial e palatina e anomalias oculares, polidactilia, mãos fechadas e os pés em cadeira de balanço.

A incidência da trissomia do 13 é de cerca de 1 em 20.000 a 25.000 nascimentos. A trissomia do 13 é clinicamente muito grave, e cerca de metade destas crianças morrem no primeiro mês. Como a maioria das outras trissomias, está associada ao aumento da idade materna, e o cromossomo extra surge de não-disjunção na meiose I materna. A cariotipagem de crianças ou fetos afetados é indicada para confirmar o diagnóstico clínico. Cerca de 20% dos casos são causados por translocação não-balanceada. O risco de recorrência é baixo. Mesmo quando um genitor de um paciente com translocação é um portador da translocação, o risco empírico de que um nativivo subseqüente tenha a síndrome é de menos de 2%.

Síndromes de Deleção Autossômica

Existem muitos relatos de deleções citogeneticamente detectáveis em pacientes dismórficos, mas a maioria destas deleções tem sido vista em apenas alguns pacientes e não está associada a sín-

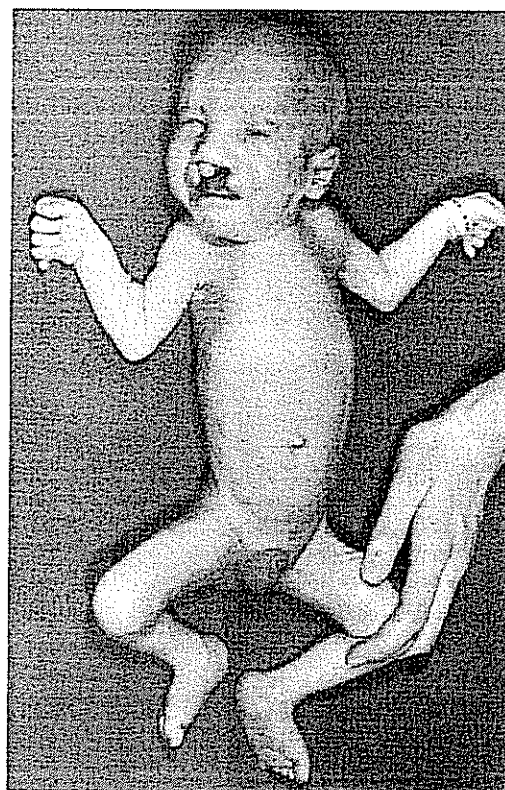



Fig. 10.6 Uma criança com trissomia do 13 Notar particularmente a fenda labial bilateral e a polidactilia (Cortesia de P E Conen, The Hospital for Sick Children, Toronto)

dromes reconhecidas. Entretanto, há várias síndromes de deleções autossômicas bem-delineadas, nas quais uma série de pacientes tem a mesma deleção ou deleções similares, resultando em uma síndrome claramente reconhecível. Em geral, as deleções autossômicas visíveis ocorrem com uma incidência estimada de 1 em 7.000 nativivos.

SÍNDROME DO *CRI DU CHAT*

Uma destas síndromes é a do *cri du chat*, na qual há uma grande deleção do braço curto do cromossomo 5. Esta síndrome de deleção recebeu este nome porque as crianças com este distúrbio têm um choro similar a um miado de gato. A síndrome é responsável por cerca de 1% de todos os pacientes com retardo mental institucionalizados. O aspecto facial, mostrado na Fig. 10.7, é característico, com microcefalia, hipertelorismo, pregas epicânticas, implantação baixa das orelhas, às vezes com proeminência pré-auricular, e micrognatia. Outras características incluem um grave retardo mental e defeitos cardíacos.

A maioria dos casos de síndrome do *cri du chat* é esporádica, e de 10% a 15% dos pacientes são a prole de portadores de translocação. Os pontos de quebra e a amplitude do segmento deletado do cromossomo 5p variam nos diferentes pacientes, mas a região crítica, que falta em todos os pacientes com o fenótipo, foi identificada como a banda 5p15. Demonstrou-se que há deleção de vários genes nos cromossomos 5p-, e a base para a relação entre a monossomia para tais genes e o fenótipo clínico está começando a ser esclarecida. Muitos dos achados clínicos parecem ser decorrentes da haploinsuficiência de um gene ou genes dentro da banda 5p15.2, e o choro em miado de gato parece ser o resultado da deleção 5p15.3.

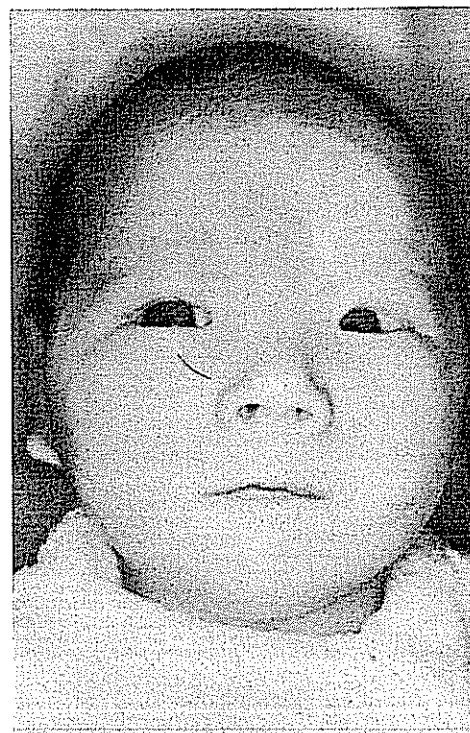



Fig. 10.7 Uma criança com a síndrome do *cri du chat*, que resulta de deleção de parte do cromossomo 5p. Notar a face característica com hipertelorismo, epicanto e retrognatia.

Síndromes de Microdeleção

Várias síndromes dismórficas estão associadas a deleções pequenas, mas às vezes citogeneticamente visíveis, levando a uma forma de desequilíbrio genético chamado de **aneussomia segmentar** (Quadro 10.2). Estas deleções produzem síndromes que em geral são reconhecidas clinicamente e que podem ser detectadas por análise cromossômica de alta resolução ou por hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) (ver Fig. 9.5, *encarte colorido*). O termo **síndrome de genes contíguos** tem sido aplicado a muitas destas condições, sendo o fenótipo atribuído à haploinsuficiência de múltiplos genes contíguos dentro da região deletada. Para outros distúrbios de deleção, o fenótipo aparentemente se deve à deleção de apenas um único gene, a despeito da associação típica de uma grande deleção à condição.

QUADRO 10–2

Síndromes de Microdeleção ou Genes Contíguos Envolvendo Recombinação entre Seqüências Repetidas

Distúrbio	Localização	Rearranjo: *Tipo*	Rearranjo: *Tamanho (kb)*	Trecho Repetido (kb)
Síndrome de Smith-Magenis / dup(17)(p11.2)	17p11.2	Deleção / Duplicação	5.000	200
Síndromes de Prader-Willi/Angelman	15q11-q13	Deleção	4.000	~50-400
Síndrome de Williams	7q11.23	Deleção	2.000	> 30
Ictiose	Xp22.3	Deleção	1.900	20
Neurofibromatose	17q11.2	Deleção	1.500	~15-100
Charcot-Marie-Tooth (*CMT1A*)/HNLPP	17p12	Duplicação / Deleção	1.500	24
Síndrome de DiGeorge/síndrome velocardiofacial / Síndrome do *cri du chat*	22q11	Deleção / Duplicação	3.000	200

HNLPP = neuropatia hereditária com propensão a paralisias de pressão

Dados atualizados de Lupski J. R. (1998) Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet 14:417-422

Para cada síndrome, o tamanho das deleções nos diferentes pacientes é similar. Na verdade, para as síndromes citadas no Quadro 10.2, os estudos moleculares e de FISH demonstraram que a localização dos pontos de quebra centroméricos e teloméricos aglomera-se entre diferentes pacientes, o que sugere a existência de seqüências propensas à deleção. O mapeamento fino de vários destes distúrbios sugeriu que os pontos de quebra localizam-se em seqüências com poucas repetições e que a recombinação aberrante entre cópias próximas das repetições causam as deleções, que envolvem de várias centenas a vários milhares de kb. Este mecanismo geral tem sido implicado em várias síndromes que envolvem rearranjos de genes contíguos (ver Quadro 10.2). As deleções e duplicações mediadas por recombinação desigual já foram documentadas (Fig. 10.8). Por exemplo, a recombinação desigual entre repetições flanqueadoras que são quase 99% idênticas em seqüência durante a meiose I pode resultar em duplicação ou deleção de uma região de 1.500 kb do cromossomo 17p11.2. A duplicação dos genes intercalares leva a uma forma de doença de Charcot-Marie-Tooth, na qual a deleção leva a uma neuropatia hereditária com propensão a paralisias de pressão (ver Quadro 10.2).

Fig. 10.8 Um crossing over desigual entre cromátides irmãs desalinhadas ou cromossomos homólogos contendo cópias altamente homólogas de uma seqüência repetida de DNA pode levar a dois produtos diferentes no número de cópias da seqüência. O número de cópias de quaisquer genes (tais como *A, B, C*) que fiquem entre as cópias da repetição mudará em conseqüência deste rearranjo genômico.

Uma microdeleção particularmente comum que é avaliada com freqüência nos laboratórios de citogenética clínica envolve o cromossomo 22q11.2 e está associada à **síndrome de DiGeorge** ou **síndrome velocardiofacial**. A síndrome de DiGeorge/velocardiofacial é uma condição autossômica dominante com expressividade variável, causada por uma deleção dentro de 22q11 que inclui 3.000 kb. Esta microdeleção, também mediada por recombinação homóloga entre seqüências com pequeno número de cópias repetidas, é uma das deleções citogenéticas mais comuns associadas a um fenótipo clínico importante e é detectada em 1 em 2.000 a 4.000 nativivos. Os pacientes apresentam anomalias craniofaciais características, retardo mental e defeitos cardíacos. A deleção na síndrome de DiGeorge/velocardiofacial é tida como tendo um papel em até 5% de todos os defeitos cardíacos congênitos e é uma causa particularmente freqüente de alguns defeitos. Por exemplo, mais de 40% dos pacientes com tetralogia de Fallot e atresia pulmonar e mais de 60% dos pacientes com tetralogia de Fallot e falta de válvula pulmonar têm esta microdeleção. Em contraste à deleção relativamente comum de 22q11.2, a duplicação de 22q11.2 é muito mais rara e leva ao dismorfismo **síndrome do olho de gato**, na qual os pacientes têm um complemento triplo ou quádruplo deste segmento do cromossomo 22.

OS CROMOSSOMOS SEXUAIS E SUAS ANOMALIAS

Os cromossomos X e Y há muito atraem o interesse, pois diferem entre os sexos, têm seus próprios padrões específicos de herança e estão envolvidos na determinação primária do sexo. Eles são estruturalmente bem distintos e estão sujeitos a formas diferentes de regulação genética, embora fiquem pareados na meiose masculina. Por todos estes motivos, eles precisam de atenção especial. Nesta seção, faremos uma revisão das anomalias comuns dos cromossomos sexuais e suas conseqüências clínicas, da situação atual dos conhecimentos quanto ao controle dos cromossomos sexuais e de outras anomalias mendelianas da diferenciação sexual.

A Base Cromossômica da Determinação do Sexo

A constituição diferente dos cromossomos sexuais das células de homens e mulheres normais vem sendo apreciada há mais de 50 anos. Logo após a análise citogenética tornar-se factível, a base fundamental do sistema XX/XY de determinação do sexo tornou-se aparente. Viu-se que os homens com síndrome de Klinefelter tinham 47 cromossomos com dois cromossomos X, bem como um cromossomo Y (cariótipo 47,XXY), enquanto as mulheres com síndrome de Turner tinham apenas 45 cromossomos com um único cromossomo X (cariótipo 45,X). *Estes achados estabeleceram pronta e firmemente o papel crucial do cromossomo Y no desenvolvimento masculino normal. Além disso, em comparação às acentuadas conseqüências das aneuplodias autossômicas, estes cariótipos revelaram os efeitos relativamente*

modestos do numero variável de cromossomos X nos homens ou nas mulheres. Hoje, a base para ambas as observações em termos da biologia única dos cromossomos X e Y é compreendida.

O Cromossomo Y

A estrutura do cromossomo Y e seu papel no desenvolvimento sexual foram determinados tanto no nível molecular quanto no nível genômico (Fig. 10.9). Na meiose masculina, os cromossomos X e Y normalmente ficam pareados por segmentos nas pontas de seus braços curtos (ver Fig. 2.8) e sofrem recombinação nesta região. O segmento pareado inclui a **região pseudo-autossômica** dos cromossomos X e Y, assim chamado porque as cópias ligadas ao X e Y desta região são homólogas e sofrem recombinação homóloga na meiose I, como os pares de autossomos (ver Cap. 5). (Um segundo segmento pseudo-autossômico, não tão bem caracterizado, está situado nas pontas distais de Xq e Yq.) Em comparação com os autossomos e o cromossomo X, o cromossomo Y é relativamente pobre em genes, devendo conter menos de 50 genes. Entretanto, as funções de uma grande proporção destes genes estão relacionadas ao desenvolvimento gonadal e genital.

Embriologia do Sistema Reprodutivo

O efeito do cromossomo Y na embriologia dos sistemas reprodutivos masculino e feminino está resumido na Fig. 10.10. Em ambos os sexos, por volta da sexta semana de desenvolvimento as células germinativas primordiais migraram de sua posição inicial extra-embrionária para as cristas gonadais, onde são circundadas por cordões sexuais para formar um par de gônadas primitivas. Até esta época, a gônada em desenvolvimento, seja cromossomicamente XX ou XY, é bipotencial e em geral é chamada de "indiferenciada".

O conceito atual é que o desenvolvimento em um ovário ou em um testículo é determinado pela ação coordenada de uma sequência de genes que normalmente levam ao desenvolvimento ovariano quando não há cromossomo Y presente ou ao desenvolvimento testicular quando há presença do Y. Ocorre a via ovariana, a menos que um gene ligado ao Y, chamado de fator determinante testicular (*TDF*), atue, levando o desenvolvimento para a via masculina.

Na presença de um cromossomo Y, o tecido medular forma testículos típicos, com túbulos seminíferos e células de Leydig, que, sob o estímulo da gonadotrofina coriônica humana da placenta, tornam-se capazes de secreção andrógena (ver Fig. 10.10). As espermatogônias, derivadas das células germinativas primordiais por 200 ou mais mitoses sucessivas, revestem as paredes dos túbulos seminíferos, onde residem junto com as células de Sertoli de suporte.

Se nenhum cromossomo Y estiver presente, a gônada forma um ovário, começando por volta da 12.ª semana de gestação. Desenvolve-se o córtex, a medula regride, e as ovogônias começam a se desenvolver dentro dos folículos (ver Fig. 10.10). Começando por volta do final do terceiro mês, as ovogônias entram na meiose I, mas (como descrito no Cap. 2) este processo é interrompido no dictióteno até que ocorra a ovulação, muitos anos depois.

Enquanto as células germinativas primordiais estão migrando para as cristas genitais, o espessamento destas indica o desenvolvimento dos dutos genitais, os dutos **mesonéfricos** (antes chamados de wolffianos) e **paramesonéfricos** (antes chamados de mullerianos). No homem, as células de Leydig dos testículos fetais produzem andrógenos, que estimulam os dutos mesonéfricos a formar os dutos genitais masculinos. As células de Ser-

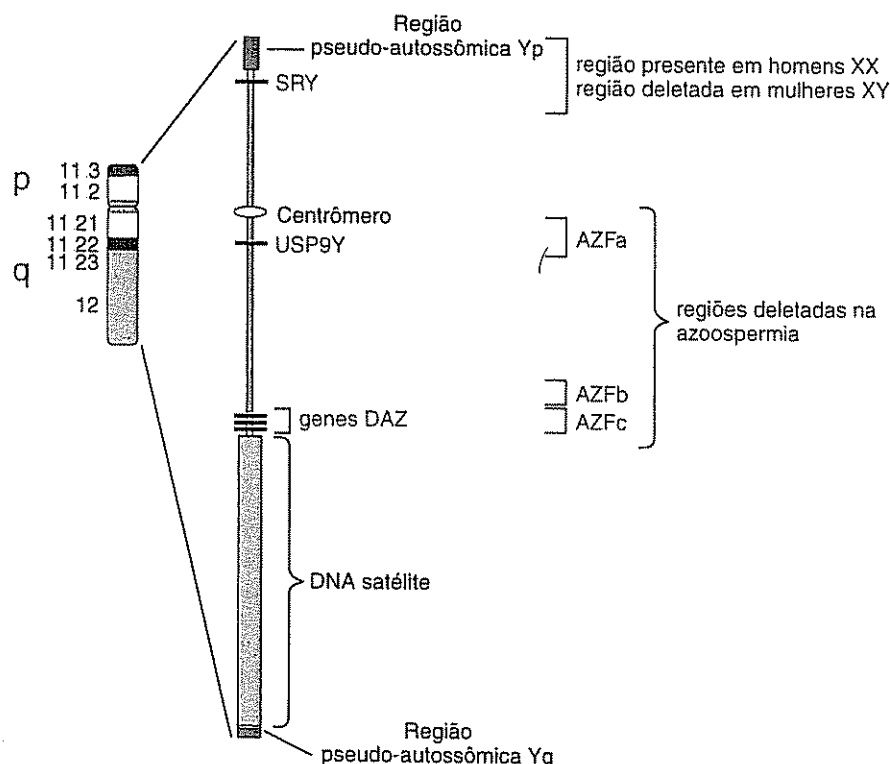



Fig. 10.9 O cromossomo Y na determinação do sexo e em distúrbios da diferenciação sexual. São indicados os genes individuais e as regiões implicados na determinação do sexo, na reversão sexual e nos defeitos da espermatogênese

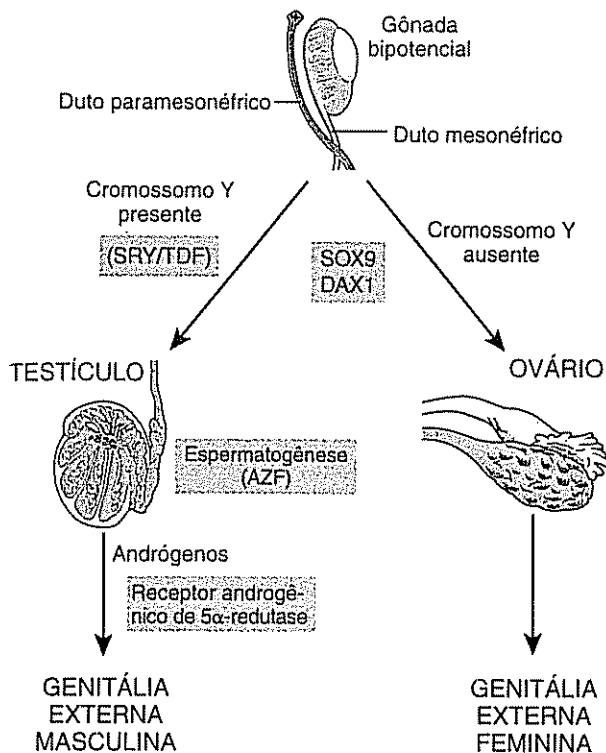



Fig. 10.10 Esquema dos eventos de desenvolvimento na determinação e na diferenciação do sexo das gônadas masculinas e femininas O envolvimento de genes individuais em etapas desenvolvimentais importantes e/ou nos distúrbios genéticos é indicado sobre fundo vermelho Ver texto para discussão

toli produzem um hormônio (substância inibidora mulleriana) que suprime a formação dos dutos paramesonéfricos. Na mulher (ou em um embrião sem gônadas), os dutos mesonéfricos regridem, e os paramesonéfricos desenvolvem-se no sistema de dutos femininos. A formação de dutos geralmente é completada no terceiro mês.

No embrião inicial, a genitália externa consiste em um tubérculo genital, crescimentos labioescrotais pareados e dobras uretrais pareadas. A partir deste estado indiferenciado, a genitália externa masculina desenvolve-se sob a influência de andrógenos. Na ausência de um testículo, a genitália externa feminina é formada independentemente da presença de ovário.

O Gene Determinante de Testículo

Os primeiros estudos citogenéticos estabeleceram a função de determinação do testículo do cromossomo Y. Mais recentemente, deleções diferentes da região pseudo-autossômica e da região especificadora do sexo do cromossomo Y em indivíduos com sexo reverso foram usadas para mapear o local exato da região primária determinante de testículo em Yp.

Embora os cromossomos X e Y normalmente façam trocas na região pseudo-autossômica durante a meiose I em Xp/Yp, em raros casos ocorre recombinação fora da região pseudo-autossômica (Fig. 10.11), o que leva a duas anomalias raras, mas altamente informativas: **homens XX** e **mulheres XY**. Cada um destes distúrbios de sexo reverso ocorre com uma incidência de cerca de 1 em 20.000 nascimentos. Os homens XX são fenotipicamente masculinos, com um cariótipo 46,XX que em geral possui algumas seqüências do cromossomo Y translocadas para o braço curto do X. De modo similar, uma proporção de mulheres fenotípicas com um cariótipo 46,XY perdeu a região determinante de testículo do cromossomo Y.

O gene *SRY* (região determinante do sexo no **Y**) fica perto do limite pseudo-autossômico no cromossomo Y, está presente em muitos homens 46,XX e é deletado ou mutado em uma proporção de pacientes femininos 46,XY, o que implica fortemente o *SRY* na determinação sexual masculina. O *SRY* é expresso apenas brevemente no início do desenvolvimento em células da crista germinal pouco antes da diferenciação dos testículos. O *SRY* codifica uma proteína de ligação ao DNA que provavelmente é um fator de transcrição, embora os genes específicos que ele regula sejam desconhecidos. De modo significativo, o gene *Sry*

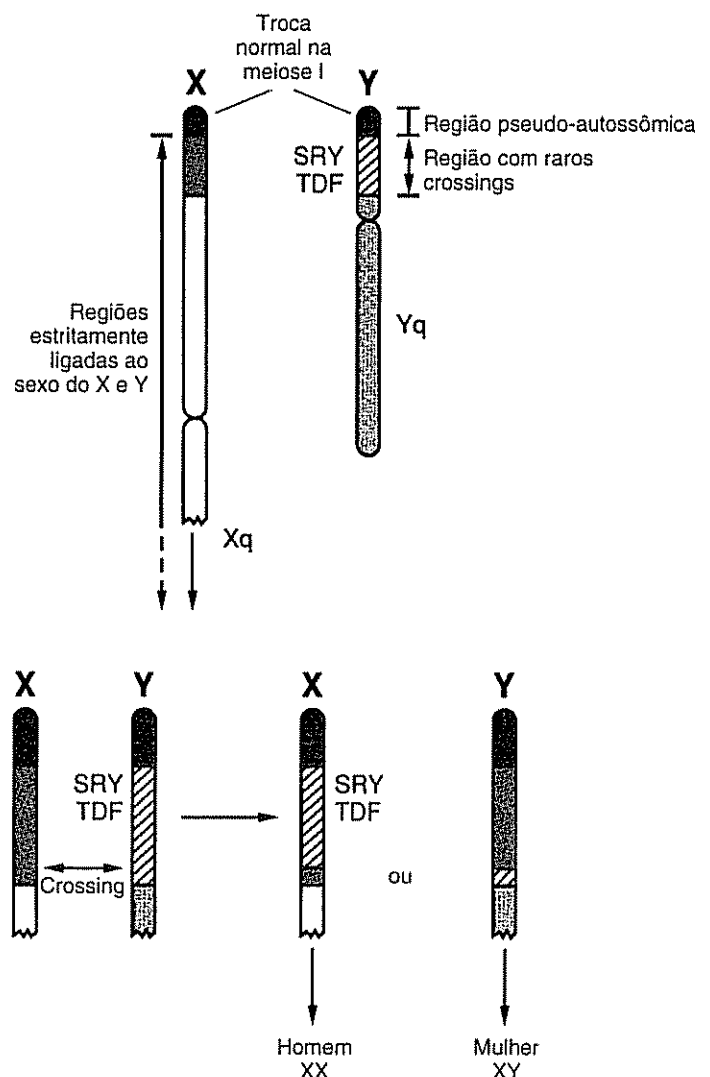



Fig. 10.11 Fatores etiológicos dos fenótipos XX masculino e XY feminino por troca aberrante entre seqüências ligadas ao X e Y Os cromossomos X e Y normalmente se recombinam dentro do segmento Xp/Yp pseudo-autossômico na meiose masculina. Se a recombinação ocorrer abaixo do limite pseudo-autossômico, entre as partes específicas de X e específicas de Y, as seqüências responsáveis pela diferenciação sexual masculina (incluindo o gene *SRY*) podem ser translocadas do Y para o X A fertilização por um espermatozóide contendo tal cromossomo X levará a um homem XX Em contraste, a fertilização por um espermatozóide contendo um cromossomo Y que perdeu o *SRY* levará a uma mulher XY

de camundongo, quando introduzido em um camundongo XX, pode causar a formação de testículo. Assim, por todos os critérios genéticos e desenvolvimentais disponíveis, o *SRY* é equivalente ao gene *TDF* no cromossomo Y.

Outros genes na via de determinação sexual estão situados no cromossomo X e nos autossomos e serão discutidos em seções posteriores.

Genes Ligados ao Y na Espermatogênese

As deleções intersticiais em Yq foram associadas a pelo menos 10% dos casos de azoospermia não-obstrutiva (sem espermatozóides detectáveis no sêmen) e a um número menor de casos de grave oligospermia (baixa contagem de espermatozóides). Estes achados sugerem que um ou mais genes, chamados de fatores de azoospermia (AZF), estão situados no cromossomo Y, e três regiões não-superpostas em Yq (AZFa, AZFb e AZFc) foram definidas (ver Fig. 10.9). A análise molecular destas deleções levou à identificação de uma série de genes que podem ser importantes na espermatogênese. Por exemplo, os genes *DAZ* (**d**eletados na **az**oospermia), situados dentro da região de deleção AZFc, codificam proteínas de ligação ao RNA expressas apenas nas células germinativas pré-meióticas dos testículos. Compatível com seu papel causal na infertilidade masculina, as deleções em Yq que incluem *DAZ* foram encontradas ocorrendo *de novo* e, quando testadas, não estão presentes nos pais ou irmãos férteis destes homens inférteis.

A prevalência de mutações AZF ou deleções na população geral masculina é desconhecida. Cerca de 2% dos homens de outro modo saudáveis são inférteis em função de graves defeitos na produção de espermatozóides, e as deleções *de novo* ou mutações podem ser responsáveis por uma parte significativa deles. Assim, os homens com infertilidade idiopática devem ser cariotipados, e os testes moleculares do cromossomo Y e a consulta genética podem ser apropriados antes de se iniciar a reprodução assistida de tais casais.

Nem todos os casos de infertilidade masculina são decorrentes de deleções *DAZ*, pois existem pelo menos duas outras regiões de deleção em Yq proximal ao genes *DAZ* (ver Fig. 10.9). Dentro de uma destas regiões, uma mutação de ponto *de novo* foi descrita em um gene, *USP9Y*, cuja função ainda não foi explicada, mas que deve ser necessária para uma espermatogênese normal.

O Cromossomo X

Como foi destacado no Cap. 9, a aneuploidia do cromossomo X está entre as anomalias citogenéticas mais comuns. A tolerância relativa do cariótipo humano às anomalias do cromossomo X podem ser explicadas em termos de **inativação do cromossomo X**. A inativação do X e suas conseqüências foram discutidas com relação aos distúrbios ligados ao X no Cap. 5. Aqui, discutiremos os mecanismos cromossômicos e moleculares da inativação do X.

Cromossomos Sexuais e o Corpúsculo de Barr

Fenótipo Sexual	Cariótipo	Corpúsculos de Barr
Homem	46,XY; 47,XYY	0
	47,XXY; 48,XXYY	1
	48,XXXY; 49,XXXYY	2
	49,XXXXY	3
Mulher	45,X	0
	46,XX	1
	47,XXX	2
	48,XXXX	3
	49,XXXXX	4

Inativação do Cromossomo X

Segundo a teoria de inativação do X, como foi introduzido no Cap. 5, nas células somáticas das mulheres normais (mas não dos homens normais) um cromossomo X é inativado, igualando, assim, a expressão de genes ligados ao X nos dois sexos. O cromossomo X inativo adota uma conformação única no núcleo e é representado nas células interfásicas pelo **corpúsculo de Barr** (Fig. 10.12). Nos pacientes com cromossomos X extra, qualquer cromossomo X além de um é inativado e forma um corpúsculo de Barr (ver Boxe).

Assim, todas as células somáticas diplóides tanto nos homens quanto nas mulheres têm um único cromossomo X ativo, independente do número total de cromossomos X ou Y presentes.

Embora o cromossomo X inativo tenha sido identificado citologicamente primeiro pela presença do corpúsculo de Barr, existem muitas características que distinguem os cromossomos X ativos e inativos. Além das informações sobre os mecanismos de inativação do X, estas características podem ser úteis diagnosticamente para identificar o X inativo. Por exemplo, o X inativo replica seu DNA mais tarde na fase S do ciclo celular que o

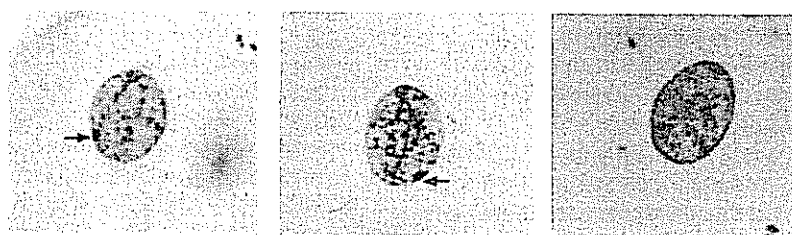



Fig. 10.12 Corpúsculos de Barr (cromatina sexual) em células epiteliais de esfregaço de mucosa bucal. As setas indicam o corpúsculo de Barr colado à membrana nuclear nas células femininas 46,XX. Uma célula masculina (*direita*) não tem corpúsculo de Barr (De Moore K L, Barr M L [1955] Smears from the oral mucosa in the determination of chromosomal sex. Lancet 2:57-58.)

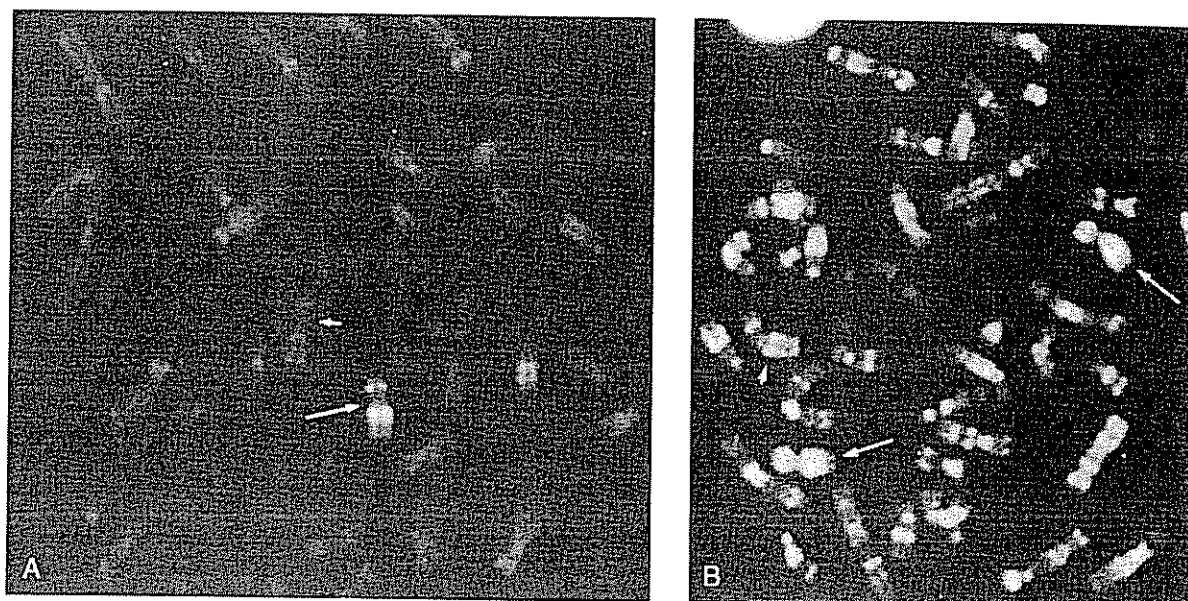



Fig. 10.13 Bandeamento de replicação tardia do cromossomo X inativo em leucócitos periféricos de uma mulher normal 46,XX (A) e uma mulher 47,XXX (B) As regiões cromossômicas de coloração clara são as que se replicam tardiamente na fase S Os cromossomos X ativos (*setas pequenas*) replicam-se sincronicamente com o resto do cariótipo Os cromossomos X inativos (*setas maiores*) replicam-se tardiamente (B originalmente por cortesia de Samuel A Latt [falecido], Children s Hospital, Boston)

X ativo. Esta assincronia de replicação entre os cromossomos X de replicação inicial e tardia pode ser reconhecida citogeneticamente por um procedimento especializado de bandeamento, chamado de "bandeamento de replicação" (Fig. 10.13).

A região promotora de muitos genes no X inativo é muito modificada pela adição de um grupo metila à citosina (ver Fig. 3.1) pela enzima DNA metiltransferase. Tal **metilação do DNA** é restrita aos dinucleotídeos CpG (ver Cap. 3) e contribui para a formação de um estado de inativação da cromatina. Esta e outras modificações da cromatina envolvendo histonas parecem ser uma parte essencial do mecanismo de inativação do X.

Como foi inicialmente mencionado no Cap. 5, a base cromossômica da inativação do X está bem estabelecida, mas nem todos os genes do X são submetidos à inativação. Uma ampla análise de expressão de mais de 250 genes ligados ao X demonstra que cerca de 10% a 15% dos genes escapam da inativação e expressam-se pelos cromossomos X ativo e inativo (Fig. 10.14). Notadamente, estes genes não são distribuídos de modo aleatório ao longo do X. Muito mais genes em Xp escapam da inativação que em Xq. Embora a base genômica e evolutiva para este achado não esteja clara, ela tem implicações importantes para a consulta genética nos casos de aneuploidia parcial do cromossomo X, pois os desequilíbrios de genes em Xp podem ter maior significado clínico que os desequilíbrios em Xq.

O Centro de Inativação do X e o Gene XIST

Pelos estudos dos cromossomos X estruturalmente anormais, inativados, o **centro de inativação do X** foi mapeado em Xq proximal, na banda Xq13 (ver Fig. 10.14) O centro de inativação do X contém um gene incomum, ***XIST***, que parece ser um locus regulador para a inativação do X. *XIST* (um acrônimo para **t**ranscritos específicos do **X** **i**nativo) tem uma característica nova de ser expresso apenas pelo alelo no X inativo. Ele é transcricionalmente silencioso no X ativo tanto nas células masculinas quanto nas células femininas. Embora o modo exato de ação de *XIST* seja desconhecido, a inativação de X não pode ocorrer em sua ausência. O produto de *XIST* é um RNA não-codificante que fica no núcleo em íntima associação com o X inativo, como parte de um complexo RNA de *XIST*/corpúsculo de Barr (Fig. 10.15).

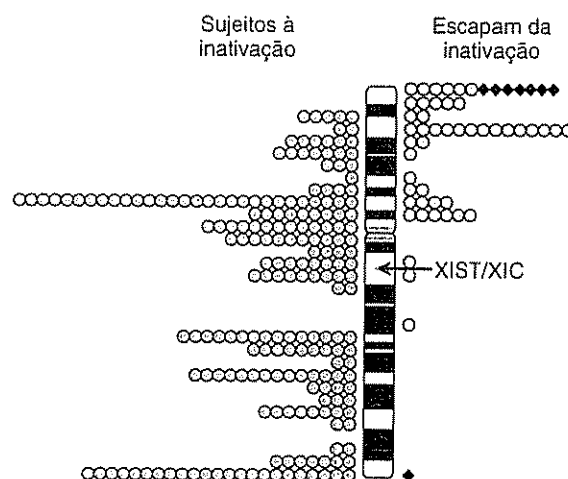



Fig. 10.14 Perfil da expressão gênica do cromossomo X. Cada símbolo indica a condição de inativação do X de um gene ligado ao X. A localização de cada símbolo indica sua posição aproximada de mapa no cromossomo X. Os genes não-expressos pelo X inativo (sujeito à inativação) estão à esquerda. Os genes expressos pelo X inativo (escapam da inativação) estão à direita. Os genes pseudoautossômicos são indicados por losangos. A localização do gene *XIST* e o centro de inativação do X (XIC) são indicados em Xq13. (Dados baseados em Carrel L., Cottle A., Goglin K. C., Willard H. F. [1999] A first-generation X inactivation profile of the human X chromosome. Proc Natl Acad Sci USA 96:14440-14444.)

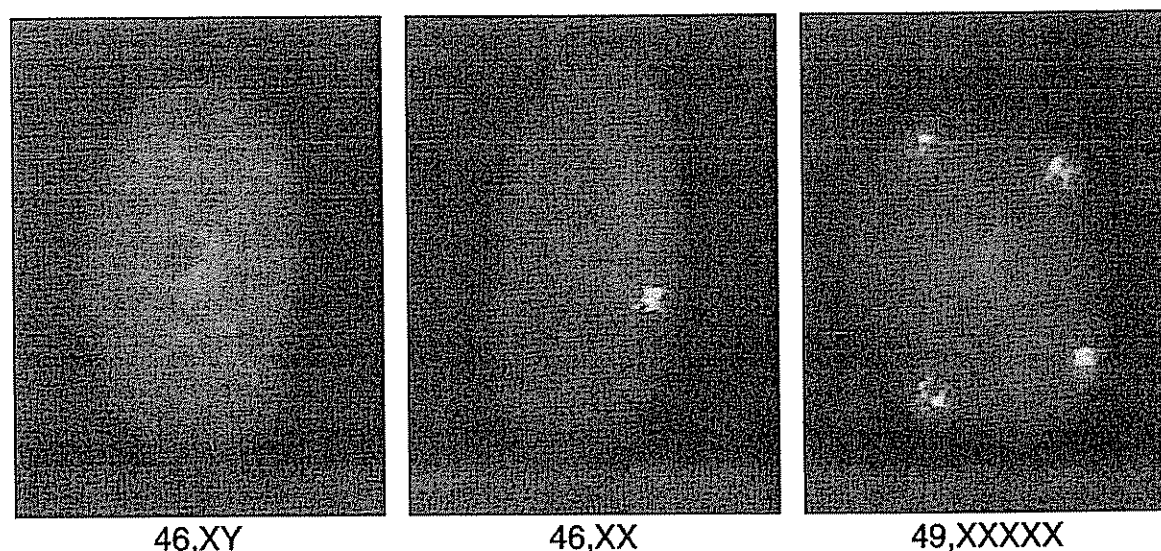



Fig. 10.15 Detecção de RNA XIST em núcleos interfásicos de um homem 46,XY, uma mulher 46,XX e uma mulher 49,XXXXX As regiões de fluorescência brilhante indicam a presença de complexos XIST RNA/corpúsculos de Barr associados a cromossomos X inativos (Cortesia de Laura Carrel, Case Western Reserve University School of Medicine, Cleveland)

Inativação Não-aleatória do X

Como foi descrito no Cap. 5, a inativação do X normalmente é aleatória nas células somáticas femininas e leva a um mosaicismo para as duas populações de células que expressam alelos de um ou do outro X (ver Fig. 5.16). Entretanto, existem exceções quando o cariótipo envolve um X estruturalmente anormal. Por exemplo, em quase todos os pacientes com anomalias estruturais não-balanceadas de um cromossomo X (incluindo deleções, duplicações e isocromossomos), o cromossomo estruturalmente anormal é sempre o X inativo, o que é provável que reflita uma seleção secundária contra células geneticamente não-balanceadas que poderiam levar a anomalias clínicas significativas (Fig. 10.16). Devido a esta inativação preferencial do X anormal, tais anomalias cromossômicas do

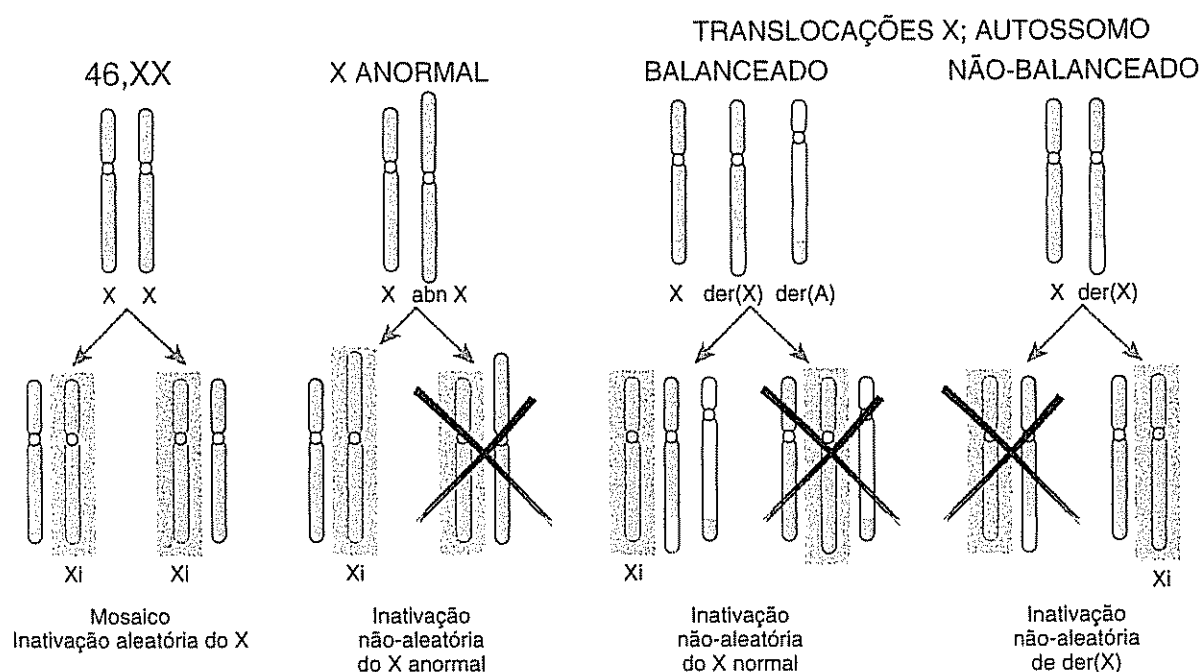



Fig. 10.16 Inativação não-aleatória do cromossomo X em cariótipos com cromossomos X anormais ou translocações X;autossomo As células femininas normais (46,XX) sofrem inativação aleatória do X Os tecidos resultantes são um mosaico de duas populações de células nas quais o X paterno ou o X materno é o inativo (Xi, indicado pelo fundo vermelho) As pessoas portadoras de um cromossomo X estruturalmente anormal (abn X) ou translocação X;autossomo em estado balanceado ou desbalanceado apresentam inativação não-aleatória do X na qual absolutamente todas as células têm o mesmo X inativo A outra população de células é inviável e/ou está em desvantagem de crescimento devido ao desequilíbrio genético e, portanto, é sub-representada ou está ausente Ver texto para maior discussão der(X) e der(A) representam os dois derivados da translocação X;autossomo

X são mais bem toleradas que as anomalias similares dos autossomos e, em conseqüência, são observadas com mais freqüência.

A inativação não-aleatória também é observada na maioria dos casos de translocação X;autossomo (ver Fig. 10.16). Se tal translocação for balanceada, o cromossomo X normal é preferencialmente inativado, e as duas partes do cromossomo translocado permanecem ativas, o que mais uma vez é provável que reflita uma seleção contra as células nas quais os genes autossômicos foram inativados. Na prole não-balanceada de um portador balanceado, entretanto, apenas o produto de translocação que porta o centro de inativação do X está presente, e este cromossomo é invariavelmente inativado. O X normal está sempre ativo. Estes padrões não-aleatórios de inativação têm o efeito geral de minimizar, mas não de eliminar, as conseqüências clínicas do defeito cromossômico em particular. Como os padrões de inativação são fortemente correlacionados com o resultado clínico, a determinação de um padrão de inativação de um X individual por análise citogenética (estudos de replicação) ou molecular (metilação do DNA) é indicada em todos os casos que envolvem translocações X;autossomo.

Uma conseqüência às vezes observada em portadores balanceados de translocações X; autossomo é que a própria quebra pode causar uma mutação pela perturbação de um gene no cromossomo X no local da translocação. A única cópia normal do gene em particular é inativada na maioria ou em todas as células devido à invativação não-aleatória do X normal, permitindo, assim, a expressão em uma mulher de uma característica ligada ao X normalmente observada apenas em homens hemizigotos. Vários genes ligados ao X foram mapeados em regiões específicas do cromossomo X quando um fenótipo típico ligado ao X foi encontrado em uma mulher que demonstrou ter uma translocação X; autossomo (ver Cap. 8). A mensagem clínica geral destes achados é que se uma paciente manifesta um fenótipo ligado ao X em geral visto apenas em homens, a análise cromossômica de alta resolução é indicada. O achado de uma translocação balanceada pode explicar a expressão fenotípica e mostrar a provável posição de mapa do gene no cromossomo X.

RETARDO MENTAL LIGADO AO X

Uma característica adicional do cromossomo X é a alta freqüência de mutações ou microdeleções que causam retardo mental ligado ao X. A incidência coletiva de retardo mental ligado ao X tem sido estimada como sendo de 1 em 500 a 1.000 nativivos. Em muitos casos, o retardo mental é uma das várias características fenotípicas anormais que juntas definem uma síndrome ligada ao X. Entretanto, existem pelo menos várias dúzias de outros genes nos quais as mutações levam a retardo mental ligado ao X isolado ou não-sindrômico, em geral do tipo de grave a profundo. O número de tais genes é compatível com o achado de muitos levantamentos em grande escala de que há de 20% a 40% de excesso de homens entre as pessoas com retardo mental. A análise cromossômica detalhada é indicada como uma avaliação inicial para excluir uma anomalia citogenética óbvia, tal como uma deleção. Além disso, o teste molecular do gene *FMR1* em Xq27.3 pode ser indicado para excluir a síndrome do X frágil (ver Cap. 12).

Anomalias Citogenéticas dos Cromossomos Sexuais

As anomalias dos cromossomos sexuais, como as anomalias dos autossomos, podem ser numéricas ou estruturais e podem estar presentes em todas as células ou em forma de mosaico. Sua taxa de incidência em nativivos, em fetos examinados na fase pré-natal e em abortos espontâneos foi comparada, no Cap. 9, com a taxa de incidência de anomalias similares dos autossomos e está resumida no Quadro 10.3. Existem várias indicações clínicas que levantariam a possibilidade de uma anomalia de cromossomo sexual e, portanto, precisam de estudos citogenéticos e/ou moleculares. Estas incluem especialmente um retardo de início na puberdade, amenorréia, infertilidade ou genitália ambígua.

A aneuploidia dos cromossomos X e Y são relativamente comuns, e as anomalias dos cromossomos sexuais estão entre os mais comuns de todos os distúrbios genéticos humanos, com uma incidência geral de cerca de 1 em 400 a 500 nascimentos. Os fenótipos associados a estes defeitos cromossômicos em geral são

QUADRO 10-3

Incidência de Anomalias de Cromossomos Sexuais

Sexo	Distúrbio	Cariótipo	Incidência Aproximada
Homem	Síndrome de Klinefelter	47,XXY	1/1.000 homens
		48,XXXY	1/25.000 homens
		Outros (48,XXYY; 49,XXXYY; mosaicos)	1/10.000 homens
	Síndrome 47,XYY	47,XYY	1/1.000 homens
	Outras anomalias do cromossomo X ou Y		1/1.500 homens
	Homens XX	46,XX	1/20.000 homens
			Incidência geral: 1/400 homens
Mulher	Síndrome de Turner	45,X	1/5.000 mulheres
		46,X,i(Xq)	1/50.000 mulheres
		Outros (deleções, mosaicos)	1/15.000 mulheres
	Trissomia do X	47,XXX	1/1.000 mulheres
	Outras anomalias do cromossomo X		1/3.000 mulheres
	Mulheres XY	46,XY	1/20.000 mulheres
	Insensibilidade androgênica	46,XY	1/20.000 mulheres
			Incidência geral: 1/650 mulheres

Dados adaptados do Quadro 9.3 e Robinson A., Linden M. G., Bender B. G. (1998) Prenatal diagnosis of sex chromosome abnormalities. *In* Milunsky A. (ed) Genetic Disorders of the Fetus, 4.ª ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 249-285.

QUADRO 10-4

Observações de Acompanhamento de Pacientes com Aneuploidias de Cromossomos Sexuais

Distúrbio	Cariótipo	Fenótipo	Desenvolvimento Sexual	Inteligência	Problemas de Comportamento
Síndrome de Klinefelter	47,XXY	Homens altos (ver texto)	Hipogonadismo; inférteis	Dificuldades de aprendizagem (alguns pacientes)	Podem ter pouco ajuste psicossocial
Síndrome XYY	47,XYY	Homens altos	Normal	Normal	Freqüentes
Trissomia do X	47,XXX	Feminino, em geral altas	Em geral normal	Dificuldades de aprendizagem (algumas pacientes)	Ocasionais
Síndrome de Turner	45,X	Mulheres baixas, características distintivas (ver texto)	Inférteis, gônadas em fita	Normal (mas ver texto)	Raros

Dados de Ratcliffe S. G., Paul N (eds) (1986) Prospective studies on children with sex chromosome aneuploidy. March of Dimes Birth Defects Foundation, Birth Defects Original Article Series 22(3). Alan R. Liss, New York; e de Rovert J., Netley C., Bailey J *et al* (1995) Intelligence and achievement in children with extra X aneuploidy: A longitudinal perspective. Am J Med Genet 60:356-363

menos graves que aqueles associados aos distúrbios autossômicos comparáveis devido à inativação do X, e o aparente baixo conteúdo gênico do Y minimiza as conseqüências clínicas do desequilíbrio de cromossomos sexuais. Os defeitos mais comuns de cromossomo sexual em nativivos e fetos são os tipos trissômicos (XXY, XXX e XYY), mas todos os três são raros em abortos espontâneos. Em contraste, a monossomia do X (síndrome de Turner) é menos freqüente em nativivos, mas é a anomalia cromossômica mais comum relatada em abortos espontâneos (ver Quadro 9.4).

As anomalias estruturais dos cromossomos sexuais são menos comuns. O defeito observado com mais freqüência é um isocromossomo do braço longo do X, i(Xq), visto em forma completa ou em mosaico em pelo menos 15% das mulheres com síndrome de Turner. O mosaicismo é mais comum para as anomalias de cromossomos sexuais que para as anomalias autossômicas e em alguns pacientes está associado a uma expressão relativamente branda do fenótipo associado.

Fig. 10.17 A. Fenótipo de um homem adulto com síndrome de Klinefelter 47,XXY. Notar os braços longos e a genitália relativamente pequena. A ginecomastia, que não está presente neste paciente, é uma característica de alguns homens Klinefelter. B. Seção de uma biópsia testicular mostrando túbulos seminíferos sem células germinativas. (De Ferguson-Smith M. A. [1966] *In* Moore K. L. [ed] The Sex Chromatin. WB Saunders. Philadelphia.)

Como um grupo, os distúrbios dos cromossomos sexuais tendem a ocorrer como eventos isolados sem fatores de predisposição aparentes, exceto para um efeito de idade materna tardia nos casos que se originam de erros da meiose I materna. Como quase todos os pacientes com anomalias de cromossomos sexuais têm apenas pequenas anomalias de desenvolvimento, uma decisão dos genitores quanto a um potencial término de uma gestação na qual o feto tenha este tipo de defeito pode ser difícil.

As quatro síndromes bem-definidas associadas à aneuploidia de cromossomos sexuais são causas importantes de infertilidade, desenvolvimento anormal ou ambos e, assim, merecem uma descrição mais detalhada. Os efeitos destas anomalias cromossômicas no desenvolvimento foram estudados por um longo período em vários centros em mais de 300 pessoas afetadas, algumas das quais foram monitoradas por mais de 30 anos. Para evitar a tendenciosidade inerente ao estudo de casos suficientemente incomuns para serem encaminhados a um centro médico para avaliação, apenas os casos detectados por triagem de neonatos ou diagnóstico parental foram usados. As principais conclusões deste importante estudo clínico estão resumidos no Quadro 10.4.

SÍNDROME DE KLINEFELTER (47,XXY)

O fenótipo da síndrome de Klinefelter, a primeira anomalia humana de cromossomos sexuais a ser relatada, é mostrado na Fig. 10.17. Os pacientes são altos, magros e têm pernas relativamente longas. Eles parecem fisicamente normais até a puberdade, quando os sinais de hipogonadismo tornam-se óbvios. A puberdade ocorre em idade normal, mas os testículos permanecem pequenos, e as características sexuais secundárias permanecem subdesenvolvidas. Os pacientes Klinefelter são quase sempre inférteis devido à falha de desenvolvimento das células germinativas e em geral são identificados clinicamente pela primeira vez em função desta infertilidade. A ginecomastia é uma característica de alguns pacientes.

A incidência é de pelo menos 1 em 1.000 nativivos masculinos (1 em 2.000 nascimentos). Como se poderia prever pelo acha-

do de que os pacientes Klinefelter 47,XXY têm um corpúsculo de Barr, um dos dois cromossomos X é inativado. Como o fenótipo é relativamente brando, ainda que variável, supõe-se que muitos casos não sejam detectados.

Cerca de metade dos casos de síndrome de Klinefelter resulta de erros na meiose I paterna, devido a uma falha na recombinação Xp/Yp na região pseudo-autossômica. Entre os casos de origem materna, a maioria resulta de erros na meiose I materna, e o restante de erros na meiose II ou de um erro mitótico pós-zigótico que leva a um mosaicismo. A idade materna é aumentada nos casos associados a erros da meiose I materna.

Cerca de 15% dos pacientes Klinefelter têm cariótipos mosaicos. Como um grupo, tais pacientes mosaico têm fenótipos variáveis. Alguns podem ter desenvolvimento testicular normal. O cariótipo mosaico mais comum é o 46,XY/47,XXY, provavelmente em conseqüência da perda de um dos cromossomos X em um concepto XXY durante uma divisão pós-zigótica inicial.

Existem muitas variantes da síndrome de Klinefelter, com outros cariótipos além do 47,XXY, incluindo 48,XXYY, 48,XXXY e 49,XXXXY. Como regra, os cromossomos X adicionais (muito embora sejam inativos) causam um fenótipo mais anormal em níveis correspondentes, com um grau maior de dismorfismo, desenvolvimento sexual mais defeituoso e prejuízo mental mais grave.

Embora exista uma grande variação fenotípica entre os pacientes com esta e outras aneuploidias de cromossomos sexuais, foram identificadas algumas diferenças fenotipicamente coerentes entre os pacientes com síndrome de Klinefelter e os homens cromossomicamente normais. A compreensão verbal e a habilidade estão abaixo daquelas apresentadas por homens normais, e os homens 47,XXY têm valores um pouco mais baixos em certos testes de desempenho intelectual (testes de QI). Os pacientes com síndrome de Klinefelter têm um risco várias vezes maior de ter dificuldades de aprendizado, especialmente em leitura, o que pode requerer uma intervenção educacional. Muitos dos meninos afetados têm um ajuste psicossocial relativamente pobre, em parte relacionado à imagem corpórea pobre. As dificuldades de linguagem podem levar ao acanhamento, à insegurança e à imaturidade

Síndrome 47,XYY

Entre todos os nascimentos de nativivos masculinos, a incidência do cariótipo 47,XYY é de cerca de 1 em 1.000. A constituição cromossômica 47,XYY não está associada a um fenótipo obviamente anormal, e os homens com este cariótipo não podem ser diferenciados dos homens normais 46,XY por qualquer característica física ou comportamental.

A origem do erro que leva ao cariótipo XYY deve ser a não-disjunção paterna na meiose II, produzindo um espermatozóide YY. As variantes menos comuns XXYY e XXXYY, que compartilham as características das síndromes XYY e de Klinefelter, provavelmente também se originam no pai, como um resultado da não-disjunção seqüencial na meiose I e na meiose II.

Os homens XYY identificados nos programas de triagem neonatal sem tendenciosidade de avaliação são altos e têm um aumento de risco de problemas educacionais ou comportamentais em comparação com os homens cromossomicamente normais. Eles têm inteligência normal e não são dismórficos. A fertilidade em geral é normal e parece haver um risco particularmente aumentado de que um homem 47,XYY tenha um filho cromossomicamente anormal. Cerca de metade dos meninos 47,XYY precisa de intervenção educacional em conseqüência de atrasos de linguagem e leitura, bem como de dificuldades para soletrar. Seus valores de QI são de cerca de 10 a 15 pontos abaixo da média.

Os genitores cujo filho é detectado na fase pré- ou pós-natal como sendo XYY em geral ficam muito preocupados quanto às implicações comportamentais. Os déficits de atenção, hiperatividade e impulsividade foram bem documentados nos homens XYY, mas uma agressividade acentuada ou psicopatologia não é uma característica comum da síndrome. Este é um ponto importante a se destacar por causa dos relatos nas décadas de 1960 e 1970 de que a proporção de homens XYY era elevada em prisões e hospícios, especialmente entre os internos de maior estatura. Hoje se sabe que esta impressão estereotipada é incorreta.

Entretanto, a incapacidade de prever o resultado em casos individuais torna a identificação de um feto XYY um dos problemas mais difíceis na consulta genética dos programas de diagnóstico pré-natal.

Trissomia do X (47,XXX)

A trissomia do X ocorre com uma incidência de 1 em 1.000 nascimentos femininos. As mulheres com trissomia do X, embora com estatura um pouco acima da média, não são fenotipicamente anormais. Algumas são identificadas pela primeira vez em clínicas de infertilidade, mas provavelmente a maioria fica sem ser diagnosticada. Os estudos de acompanhamento mostraram que as mulheres XXX desenvolvem as mudanças da puberdade em idade apropriada e em geral são férteis, embora tenham um risco um pouco aumentado de prole cromossomicamente anormal. Há um déficit significativo de desempenho nos testes de QI, e cerca de 70% das pacientes têm alguns problemas de aprendizagem. Uma psicopatologia grave e um comportamento anti-social parecem ser raros. Entretanto, o comportamento anormal é aparente, especialmente durante a transição da adolescência para o início da vida adulta.

Nas células 47,XXX, dois dos cromossomos X são inativos e de replicação tardia (ver Fig. 10.13), como sugerido originalmente pelo achado de dois corpúsculos de Barr. Quase todos os casos resultam de erros na meiose materna, e destes a maioria é na meiose I. Há um efeito de aumento da idade materna, restrito às pacientes nas quais o erro foi na meiose I materna.

A síndrome de tetrassomia do X (48,XXXX) está associada a um retardo mais grave tanto no desenvolvimento físico quanto mental, e a síndrome de pentassomia do X (49,XXXXX), a despeito da presença de quatro cromossomos X inativos (ver Fig. 10.15), em geral inclui um grave retardo de desenvolvimento com múltiplos defeitos físicos.

Síndrome de Turner (45,X e Variantes)

Ao contrário de outras aneuploidias de cromossomos sexuais, as mulheres com síndrome de Turner em geral podem ser identificadas ao nascimento ou antes da puberdade por suas características fenotípicas distintas (Fig. 10.18). A síndrome de Turner é muito menos comum que outras aneuploidias de cromossomos sexuais. A incidência do fenótipo da síndrome de Turner é de cerca de 1 em 4.000 nativivos femininos, embora números muito mais altos tenham sido relatados em alguns levantamentos.

A constituição cromossômica mais importante na síndrome de Turner é 45,X (às vezes incorretamente escrita como 45,XO), sem o segundo cromossomo sexual. Entretanto, cerca de 50% dos ca-

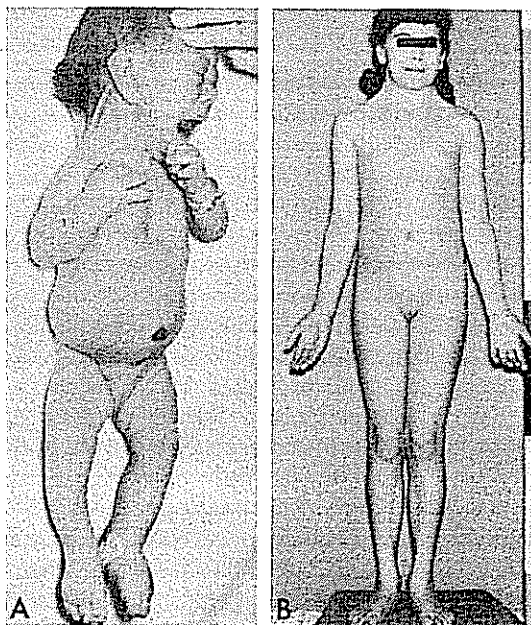



Fig. 10.18 Fenótipo de mulheres com síndrome de Turner 45,X. A. Neonato. Notar o pescoço alado e o linfedema nas mãos e nos pés. B, Uma menina de 13 anos que apresenta as características clássicas de Turner, incluindo baixa estatura, pescoço alado, maturação sexual retardada e tórax largo e em escudo com mamilos muito espaçados. (De Moore K. L. [1966] The Sex Chromactin. WB Saunders. Philadelphia.)

sos tem outros cariótipos. Cerca de um quarto dos casos de síndrome de Turner envolve cariótipos mosaicos, nos quais apenas uma proporção das células é 45,X. Os cariótipos mais comuns e suas prevalências relativas aproximadas são os seguintes:

45,X	50%
46,X,i(Xq)	15%
45,X/46,XX (mosaicos)	15%
45,X/46,X,i(Xq) (mosaicos)	cerca de 5%
45,X, outra anomalia de X	cerca de 5%
Outros mosaicos 45,X/?	cerca de 5%

A constituição cromossômica é clinicamente significativa; por exemplo, as pacientes com i(Xq) são similares às pacientes 45,X, enquanto as pacientes com deleção de Xp têm baixa estatura e malformações congênitas e aquelas com deleção de Xq em geral têm apenas disfunção gonadal.

As anomalias típicas da síndrome de Turner incluem baixa estatura, disgenesia gonadal (em geral gônadas em fita, refletindo a falha de manutenção ovariana), face incomum característica, pescoço alado, linha baixa de implantação dos cabelos, tórax em escudo com mamilos muito espaçados e uma freqüência elevada de anomalias renais e cardiovasculares. Ao nascimento, as crianças com esta síndrome em geral têm edema no dorso dos pés, um sinal diagnóstico útil (ver Fig. 10.18). Muitas pacientes têm coartação da aorta, e as mulheres com síndrome de Turner correm um risco particular de anomalias cardiovasculares. O linfedema pode estar presente na vida fetal, causando higroma cístico (visível na ultra-sonografia), que é a causa do pescoço alado visto após o nascimento. Hoje, a terapia com hormônio de crescimento é padrão na síndrome de Turner e pode resultar em um ganho de 6 a 10 cm na altura final.

A inteligência nas mulheres com síndrome de Turner em geral é média ou acima da média. Entretanto, as pacientes muitas vezes apresentam uma deficiência na percepção espacial, na organização motora perceptiva ou na execução motora fina. Em conseqüência, o QI não-verbal é significativamente inferior ao QI verbal, e muitas pacientes precisam de intervenção educacional, especialmente em matemática. As mulheres com síndrome de Turner têm um risco elevado de ajuste social prejudicado. Uma comparação entre as meninas 45,X com um X materno e aquelas com um X paterno mostraram evidências de habilidades cognitivas sociais significativamente piores naquelas com um X derivado da mãe. Como o *imprinting* pode explicar este efeito de origem parental, a possibilidade de um gene ligado ao X imprintado que aumenta a memória visual-espacial está sendo investigada.

A alta taxa de incidência de 45,X nos abortos espontâneos já foi mencionada. Esta anomalia única está presente em 1% a 2% de todos os conceptos. A sobrevida a termo é um resultado raro, e mais de 99% de tais fetos são abortados espontaneamente. O único X é de origem materna em cerca de 70% dos casos. Em outras palavras, o erro cromossômico geralmente é paterno. A base para a freqüência incomumente alta de perda do cromossomo X ou Y é desconhecida. Além disso, não está claro por que o cariótipo 45,X em geral é letal no útero, mas aparentemente é compatível com a sobrevida pós-natal. Os genes "ausentes" responsáveis pelo fenótipo da síndrome de Turner devem residir nos cromossomos X e Y. Sugeriu-se que os genes responsáveis estão entre aqueles que escapam da inativação do X (ver Fig. 10.14).

Cromossomos X em anel são ocasionalmente observados em pacientes com baixa estatura, disgenesia gonadal e retardo mental. Como o retardo mental não é uma característica da síndrome de Turner, a presença de retardo mental com ou sem outras anomalias físicas associadas nas pessoas com um cariótipo 46,X,r(X) tem sido atribuída ao fato de que os pequenos cromossomos X em anel não têm o centro de inativação do X e não expressam o gene *XIST*. A falta de inativação do X em anel nestas pacientes leva a uma hiperexpressão dos genes ligados ao X que normalmente são sujeitos à inativação. A descoberta de um X em anel em um diagnóstico pré-natal pode levar a uma grande incerteza e são indicados estudos de expressão de *XIST*. Grandes anéis contendo o centro de inativação do X e expressando *XIST* seriam preditivos de um fenótipo da síndrome de Turner. Um pequeno anel sem *XIST*, ou não o expressando seria preditivo de um fenótipo muito mais grave.

Distúrbios do Desenvolvimento Sexual e Gonadal

O sexo genético de um embrião é estabelecido na época da fertilização. No início deste capítulo, discutimos o papel da determinação sexual primária do cromossomo Y. Aqui examinaremos o papel de vários genes autossômicos e ligados ao X no desenvolvimento ovariano e testicular e no desenvolvimento da genitália externa masculina e feminina.

Para algumas crianças neonatas, a determinação do sexo é difícil ou impossível, pois a genitália é ambígua, com anomalias que tendem a torná-la parecida com a do sexo cromossômico oposto. Tais anomalias podem variar desde a hipospadia branda nos homens (uma anomalia desenvolvimental na qual a uretra abre-se abaixo do pênis ou no períneo) a um clitóris aumentado nas mulheres. Em alguns pacientes, tanto o tecido ovariano quanto testicular estão presentes, uma condição chamada de **hermafroditismo**. Tais problemas não indicam necessariamente uma

anomalia citogenética dos cromossomos sexuais, mas podem ser devidos a defeitos monogênicos ou a causas não-genéticas. A determinação do cariótipo da criança é uma parte essencial da investigação de tais pacientes.

Mau Desenvolvimento Gonadal

Vários genes autossômicos e ligados ao X foram implicados na conversão da gônada bipotencial (indiferenciada) em testículo ou ovário (ver Fig. 10.10). A análise detalhada de um subgrupo de **mulheres 46,XY sexo-revertidas** nas quais o gene *SRY* não foi deletado ou mutado revelou uma duplicação de uma parte do braço curto do cromossomo X. O gene *DAX1* em Xp21 codifica um fator de transcrição que tem um papel de sensibilizar a dose na determinação do sexo gonadal, indicando uma interação fortemente regulada entre *DAX1* e *SRY*. Um excesso de *SRY* em um ponto crítico do desenvolvimento leva à formação de testículo. Um excesso de *DAX1*, resultante da duplicação do gene, pode suprimir a função normal determinante de masculinidade do *SRY*, resultando em um desenvolvimento ovariano.

A **displasia camptomélica**, decorrente de mutações no gene *SOX9* no cromossomo 17q, é um distúrbio autossômico dominante com malformações em geral letais de ossos e cartilagens. Entretanto, cerca de dois terços dos pacientes 46,XY com este distúrbio são sexo-revertidos e são fenotipicamente mulheres. O *SOX9* normalmente é expresso no início do desenvolvimento na crista genital e, portanto, parece ser necessário para a formação normal do testículo (além de seu papel em outros aspectos do desenvolvimento). Na sua ausência, os testículos não se formam e o padrão ovariano *default* é seguido. Curiosamente, a duplicação de *SOX9* pode levar a XX sexo-reverso, sugerindo que a hiperprodução de *SOX9*, mesmo na ausência de *SRY*, pode iniciar a formação de testículo.

Outros loci autossômicos também têm sido implicados no desenvolvimento gonadal. Os pacientes cromossomicamente masculinos com a **síndrome de Denys-Drash** podem ter genitália externa feminina ou ambígua. O gene *WT1* em 11p13 (também implicado no tumor de Wilms, uma neoplasia renal infantil) codifica um fator de transcrição que está envolvido na interação das células de Sertoli e Leydig na gônada em desenvolvimento. As mutações dominantes *WT1* aparentemente perturbam o desenvolvimento testicular normal.

Um defeito citogenético bem-caracterizado, às vezes associado ao sexo reverso 46,XY, é a **síndrome de deleção 9p**. Comparando pacientes com deleções diferentes, a região necessária para o desenvolvimento sexual masculino normal foi centrada em 9p24. Esta região contém o gene *DMRT1*, que codifica outro fator de transcrição expresso exclusivamente na gônada em desenvolvimento.

Pseudo-hermafroditismo Feminino

Os pseudo-hermafroditas são "pseudo" porque, ao contrário dos hermafroditas verdadeiros, têm tecido gonadal apenas de um sexo. Os pseudo-hermafroditas femininos têm cariótipos 46,XX com tecido ovariano normal, mas com genitália externa ambígua ou masculina.

O pseudo-hermafroditismo feminino em geral se deve à **hiperplasia adrenal congênita**, um distúrbio autossômico recessivo que surge de defeitos específicos em enzimas do córtex supra-renal necessárias para a biossíntese de cortisol, resultando na virilização de crianças femininas. O desenvolvimento ovariano é normal, mas a produção excessiva de andrógenos causa masculinização da genitália externa, com aumento do clitóris e fusão labial para formar uma estrutura similar à bolsa escrotal (Fig. 10.19).

Embora qualquer uma das várias etapas enzimáticas possa estar defeituosa na hiperplasia adrenal congênita, o defeito mais comum é a deficiência de 21-hidroxilase, que tem uma incidência de cerca de 1 em 12.500 nascimentos. A deficiência de 21-hidroxilase bloqueia a via normal de biossíntese, causando a hiperprodução dos precursores, que são então desviados para uma via de biossíntese de andrógenos, causando níveis anormalmente altos de andrógenos. Enquanto as meninas com deficiência de 21-hidroxilase nascem com genitália ambígua, os meninos afetados têm genitália externa normal e podem não ser reconhecidos no início da lactância. Dentre os pacientes com a deficiência de 21-hidroxilase clássica, 25% têm o tipo virilizante simples e 75% têm o tipo com perda de sal, que é clinicamente mais grave e pode levar à morte neonatal. Um teste de triagem desenvolvido para identificar a condição em neonatos, no qual algumas gotas de sangue do calcanhar são colhidas em papel-filtro, hoje é usado em muitos países. Ele é valioso para evitar as graves conseqüências do defeito da perda de sal no início da lactância e no pronto diagnóstico de homens e mulheres afetados.

Pseudo-hermafroditismo Masculino

Além dos distúrbios de formação do testículo durante o desenvolvimento embriológico, as causas do pseudo-hermafroditismo em pessoas 46,XY incluem anomalias de gonadotrofinas, erros inatos da biossíntese e do metabolismo de testosterona e anomalias das células-alvo de andrógenos. Estes distúrbios são heterogêneos tanto genética quanto clinicamente e, em alguns casos, podem corresponder a manifestações brandas da mesma causa subjacente ao hermafroditismo verdadeiro.

Fig. 10.19 Genitália externa masculinizada de uma criança 46,XX causada por hiperplasia adrenal congênita (forma virilizante). Ver texto para discussão. (De Moore K. L., Persaud T. V. N. [1993] The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 5.ª ed. WB Saunders. Philadelphia.)

Existem várias formas de insensibilidade androgênica que resultam em pseudo-hermafroditismo masculino. Um exemplo é a deficiência do esteróide **5α-redutase**, a enzima responsável por converter o hormônio masculino testosterona em sua forma ativa diidrotestosterona. Esta condição autossômica recessiva resulta em feminização da genitália externa dos homens afetados. Embora o desenvolvimento testicular seja normal, o pênis é pequeno e há uma vagina em fundo cego. A atribuição do sexo pode ser difícil.

Um outro distúrbio bem-estudado é uma síndrome ligada ao X conhecida como **síndrome de insensibilidade androgênica** (antes conhecida como **feminização testicular**). Neste distúrbio, as pessoas afetadas são cromossomicamente masculinas (cariótipo 46,XY), com genitália externa feminina aparentemente normal, com uma vagina em fundo de saco, sem útero ou tubas uterinas (Fig. 10.20). A incidência de insensibilidade androgênica ocorre em cerca de 1 em 20.000 nativivos. Os pêlos axilares e pubianos são raros. Como indica o nome alternativo "feminização testicular", os testículos estão presentes no abdome ou no canal inguinal, onde às vezes são confundidos com hérnias em crianças que, quanto ao mais, parecem meninas normais. Embora os testículos secretem andrógenos normalmente, há uma falta de resposta do órgão-alvo aos andrógenos, o que resulta da ausência de receptores androgênicos no citosol das células-alvo apropriadas. A proteína receptora, especificada pelo alelo normal no locus ligado ao X de receptor de andrógeno, tem o papel de formar um complexo com a testosterona e a diidrotestosterona. Se o complexo não se forma, o hormônio não entra no núcleo para se ligar à cromatina e estimular a transcrição dos genes-alvo necessários para a diferenciação no sentido masculino. O defeito molecular foi determinado em centenas de casos e varia de uma deleção completa do gene de receptor de andrógeno no cromossomo X (ver Fig. 4.8) a mutações de ponto nos domínios de ligação de andrógeno ou ligação ao DNA da proteína receptora de andrógeno.

Fig. 10.20 Síndrome de insensibilidade androgênica completa (feminização testicular) em uma pessoa 46,XY. Notar os contornos femininos, a ausência de pêlos axilares, os poucos pêlos pubianos e o desenvolvimento de mamas. (Cortesia de L. Pinsky, McGill University, Montreal.)

Referências Gerais

Gardner RJM, Sutherland GR (1996) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, England.

Grumbach MM, Conte FA (1998) Disorders of sex differentiation. *In* Williams Textbook of Endocrinology, 9th ed. JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg, PR Larson (eds). WB Saunders, Philadelphia.

Hassold TJ, Patterson D (eds) (1999) Down Syndrome: A Promising Future Together. Wiley-Liss, New York.

Hsu LYF (1998) Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. *In* Milunsky A (ed) Genetic Disorders and the Fetus, 4th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 179–248.

Moore KL, Persaud TVN (1993) The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 5th ed. WB Saunders, Philadelphia.

Pinsky L, Erickson RP, Schimke RN (1999) Genetic Disorders of Human Sexual Development. Oxford University Press, Oxford, England.

Robinson A, Linden MG, Bender BG (1998) Prenatal diagnosis of sex chromosome abnormalities. *In* Milunsky A (ed) Genetic Disorders of the Fetus, 4th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 249–285.

Shaffer LG, Ledbetter DH, Lupski JR (2000) Molecular cytogenetics of contiguous gene syndromes: Mechanisms and consequences of gene dosage imbalance. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Stevenson RE, Schwartz CE, Schroer RJ (2000) X-Linked Mental Retardation. Oxford University Press, Oxford, England.

Willard HF (2000) The sex chromosomes and X chromosome inactivation. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, et al (1998) A chromosomal deletion map of human malformations. Am J Hum Genet 63:1153–1159.

Budarf ML, Emanuel BS (1997) Progress in the autosomal segmental aneusomy syndromes: Single or multi-locus disorders? Hum Mol Genet 6:1657–1665.

Carrel L, Cottle A, Goglin KC, Willard HF (1999) A first-generation X inactivation profile of the human X chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14440–14444.

Kola I, Hertzog PJ (1997) Animal models in the study of the biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome. Hum Mol Genet 6:1713–1727.

Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, et al (1996) Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to nondisjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. Nat Genet 14:400–405.
Lindsay EA, Baldini A (1998) Congenital heart defects and 22q11 deletions: Which genes count? Mol Med Today 4:350–357.
Lupski JR (1998) Genomic disorders: Structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet 14:417–422.
Overhauser J, Huang X, Gersh M, et al (1994) Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5: Sublocalization of the critical region for the cri du chat syndrome. Hum Mol Genet 3:247–252.
Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, et al (1997) Microdeletions of the Y chromosome of infertile men. N Engl J Med 336:534–539.
Ratcliffe SG, Paul N (eds) (1986) Prospective studies on children with sex chromosome aneuploidy. March of Dimes Birth Defects Foundation, Birth Defects Original Article Series 22(3). Alan R. Liss, New York
Reijo R, Lee TY, Salo P, et al (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. Nat Genet 10:383–393.
Rovert J, Netley C, Bailey J, et al (1995) Intelligence and achievement in children with extra X aneuploidy: A longitudinal perspective. Am J Med Genet 60:356–363.
Skuse DH (1999) Genomic imprinting of the X chromosome: A novel mechanism for the evolution of sexual dimorphism. J Lab Clin Med 133:23–32.
Sun C, Skaletsky H, Birren B, et al (1999) An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y chromosomal gene USP9Y. Nat Genet 23:429–432.
The Chromosome 21 Mapping and Sequencing Consortium (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. Nature 405:311–319.

Problemas

1. Em uma mulher com cariótipo 47,XXX, que tipos de gametas teoricamente são formados e em que proporções? Quais os cariótipos e fenótipos teóricos de sua prole? (Na verdade, uma mulher triplo X quase sempre tem filhos apenas com cariótipos normais.)

2. Uma de suas pacientes é uma menina com hemofilia A grave, um distúrbio recessivo ligado ao X.
   (a) Você é aconselhado a obter uma análise do cariótipo da criança. Por quê? Que mecanismos podem permitir a ocorrência de um fenótipo recessivo ligado ao X em uma mulher?
   (b) O laboratório relata que a criança tem uma translocação X;autossomo, com um ponto de quebra no cromossomo X em Xq28. Como isto pode explicar o fenótipo dela?

3. As taxas de incidência ao nascimento de homens 47,XXY e 47,XYY são aproximadamente iguais. Isto é o que você esperaria com base nas origens possíveis dos dois cariótipos anormais? Explique.

4. Como uma pessoa com um cariótipo XX pode se diferenciar como um homem fenotípico?

5. Uma menina apresenta-se com massas inguinais bilaterais que são tidas como hérnias, mas que são testículos nos canais inguinais. Que cariótipo você esperaria encontrar na criança? Qual é o seu distúrbio? Que consulta genética você ofereceria aos genitores?

6. Em uma menina com genitália ambígua diagnostica-se deficiência de 21-hidroxilase do tipo com perda de sal. Que cariótipo você esperaria encontrar? Qual é o seu distúrbio? Que consulta genética você ofereceria aos genitores?

7. Quais as conseqüências clínicas que se poderia esperar das deleções que se seguem? Se a mesma quantidade de DNA é deleta-da em cada caso, por que a gravidade de cada um pode ser dife-rente?
   (a) 46,XX,13p$^-$
   (b) 46,XYq$^-$
   (c) 46,XX,5p$^-$
   (d) 46,XXq$^-$

8. Discuta as conseqüências clínicas da inativação do cromossomo X. Forneça as possíveis explicações para o fato de que as pessoas com aneuploidia do cromossomo X não são totalmente normais em termos clínicos.

9. Em uma clínica de genética, você está consultando cinco mulheres grávidas que perguntam sobre seu risco de ter um feto com síndrome de Down. Quais são seus riscos e por quê?
   (a) uma mulher com 23 anos mãe de um filho com trissomia do 21
   (b) uma mulher com 41 anos mãe de um filho com trissomia do 21
   (c) uma mulher com 27 anos cuja sobrinha tem síndrome de Down
   (d) uma portadora de translocação robertsoniana 14;21
   (e) uma mulher cujo marido é portador de uma translocação robertsoniana 14;21

11

Fundamentos das Doenças Moleculares: Lições das Hemoglobinopatias

Uma doença molecular é aquela na qual o evento primário causador da doença é uma mutação, seja herdada ou adquirida. Este capítulo destaca a genética básica e os mecanismos bioquímicos subjacentes às doenças genéticas, usando distúrbios da hemoglobina, as **hemoglobinopatias**, como exemplos. Esta visão geral dos mecanismos será ampliada no Cap. 12, a fim de incluir outras doenças genéticas que são importantes porque ilustram princípios adicionais de genética em medicina.

O conhecimento da patologia molecular é a base da terapia racional e do tratamento das doenças genéticas. Além disso, tal conhecimento em geral também é instrutivo no que diz respeito ao funcionamento normal. O estudo do fenótipo no nível das proteínas, da bioquímica e do metabolismo constitui a disciplina **genética bioquímica**. Uma doença genética ocorre quando uma alteração no DNA de um gene essencial muda a quantidade, a função ou ambas dos produtos gênicos (RNA mensageiro [mRNA] e proteína). Os distúrbios monogênicos quase sempre resultam de mutações que alteram a função de uma proteína. As únicas exceções conhecidas a esta generalização são as mutações encontradas em vários genes do DNA mitocondrial que codificam RNAs transportadores (tRNAs). Estas mutações levam a graves condições neurológicas que afetam os músculos ou o cérebro (ver Cap. 12).

Não é possível compreender a patogenia de uma doença genética sem conhecer as anomalias bioquímicas primárias que resultam da alteração no funcionamento gênico. Mutações que causam doenças foram identificadas em mais de 1.000 das cerca de 4.500 doenças monogênicas (tanto autossômicas quanto ligadas ao X) hoje conhecidas. Embora seja impressionante que o defeito molecular básico tenha sido encontrado em tantos distúrbios, devemos perceber que a fisiopatologia não é totalmente compreendida para *nenhuma* doença genética. A **anemia falciforme**, discutida mais adiante, está entre os distúrbios hereditários mais bem caracterizados e, mesmo aqui, o conhecimento é incompleto, embora esta tenha sido a primeira doença molecular a ser reconhecida (por Linus Pauling, em 1949). Entretanto, o estudo das doenças genéticas nos vários níveis fenotípicos (gene, proteína, célula, tecido, corpo todo) tem dado muitas informações à medicina, não apenas sobre os distúrbios específicos, mas também sobre a biologia normal do corpo humano.

O EFEITO DA MUTAÇÃO NO FUNCIONAMENTO PROTEICO

Os quatro efeitos possíveis das mutações causadoras de doença sobre o funcionamento proteico são destacados na Fig. 11.1. Uma **perda de função** da proteína é a conseqüência mais comum da mutação. Sugem muitas condições importantes, entretanto, a partir de três outros mecanismos: (1) um **ganho de função**; (2) a aquisição de uma **nova propriedade** pela proteína mutante ou (3) a expressão de um gene na época errada (**expressão heterocrônica**), no local errado (**expressão ectópica**), ou ambos.

Mutações de Perda de Função

A perda de função de um gene pode resultar de mutações em seus elementos codificantes ou em seus elementos reguladores, bem como de perturbação por inserções ou deleções de seqüências cruciais. A perda de função decorrente de uma redução na dosagem gênica é exemplificada pelas **α-talassemias**, que de maneira mais comum se devem a deleções de genes de α-globulina (ver discussão mais adiante); pelas doenças de perda cromossômica, tais como as monossomias da síndrome de Turner (ver Caps. 9 e 10), e pelas mutações somáticas adquiridas, em geral deleções, que ocorrem em genes supressores tumorais em muitos cânceres (tais como o **retinoblastoma**, ver Cap. 16). Em adição à redução da dosagem gênica, uma perda total de função também pode resultar da introdução de um códon finalizador prematuro, devido a uma mutação sem sentido que converte um códon em um finalizador ou a uma mudança de matriz de leitura que introduz um códon finalizador. As mutações de sentido trocado e outras mutações na seqüência codificante também podem abolir ou prejudicar o funcionamento, bem como tornar a proteína instável, reduzindo, assim, sua abundância. Todas estas classes de mutação são ilustradas pelas **β-talassemias** (ver discussão mais

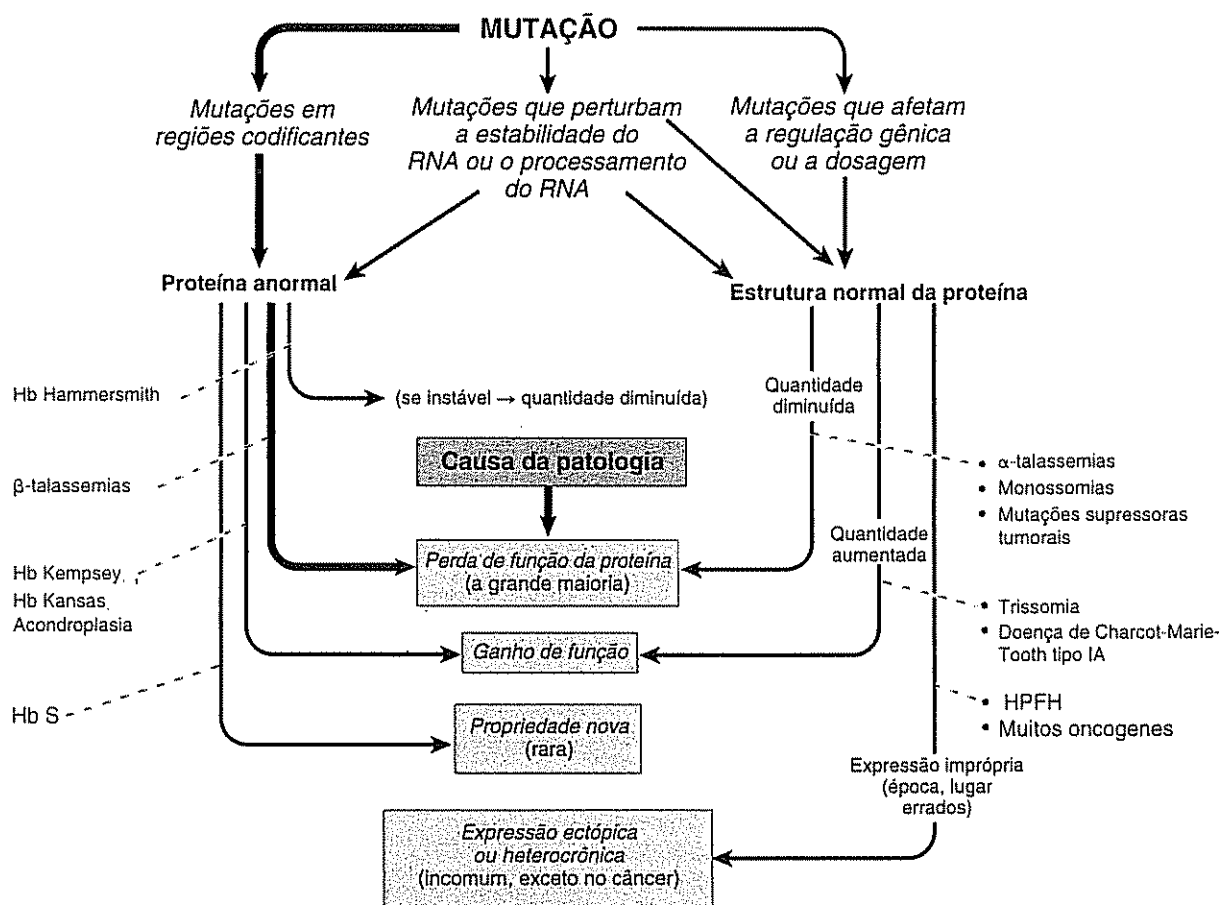



Fig. 11.1 Um esquema geral dos mecanismos pelos quais as mutações que causam doença produzem patologia. As mutações na região codificante resultam em proteínas estruturalmente anormais, que têm uma perda de ou um ganho de função ou uma nova propriedade, que causa a doença. As mutações em seqüências não-codificantes em geral são de dois tipos: (1) as que alteram a estabilidade ou a recomposição do mRNA ou (2) as que perturbam elementos reguladores ou mudam a dosagem gênica. As mutações nos elementos reguladores alteram a abundância do mRNA ou a época ou o tipo de célula no qual o gene é expresso. As mutações na região codificante ou domínios reguladores podem diminuir a quantidade da proteína produzida.

adiante), um grupo de hemoglobinopatias que resultam de uma redução na quantidade de β-globina, uma das principais proteínas da hemoglobina adulta nas hemácias. Como se pode esperar, a gravidade da doença que resulta das mutações de perda de função em geral está relacionada à quantidade de função perdida. Em muitos casos, a retenção de quantidades muito pequenas de função residual pela proteína mutante pode reduzir muito a gravidade da doença, uma situação bem ilustrada por defeitos enzimáticos que levam a vários graus de hiperfenilalaninemia, cuja forma mais grave é chamada de **fenilcetonúria (PKU)** (ver Cap. 12).

Mutações de Ganho de Função

As mutações também podem alterar o fenótipo bioquímico acentuando o funcionamento de uma proteína. Mais não significa necessariamente melhor, entretanto, e isso pode resultar em uma doença. Este efeito deve-se a (1) um aumento no nível da expressão da proteína, ou (2) a um aumento na habilidade de cada molécula proteica para desempenhar uma ou mais funções normais. É crucial reconhecer quando uma doença é decorrente de uma mutação de ganho de função, pois o tratamento da doença resultante deve necessariamente diferir dos distúrbios que surgem de outros mecanismos, tais como as doenças causadas por mutações de perda de função. Além disso, as mutações de ganho de função em geral nos dão informações sobre a regulação da expressão do gene afetado ou da base molecular da função de uma proteína.

Mutações que Acentuam a Função Normal de uma Proteína. Raramente, as mutações na região codificante podem aumentar a habilidade de cada molécula proteica para desempenhar uma função normal, mas são prejudiciais para a atividade fisiológica geral da proteína. Novamente, as mutações nos genes de globina estão entre as mutações mais bem compreendidas deste tipo e incluem as mutações de sentido trocado, tais como a hemoglobina Kempsey, que fixa a hemoglobina em sua alta afinidade por oxigênio, reduzindo assim a liberação de oxigênio para os tecidos. Um outro exemplo deste fenômeno ocorre sob a forma de uma baixa estatura chamada de **acondroplasia**, na qual uma única substituição de aminoácido no receptor 3 do fator de crescimento de fibroblasto (FGFR3) leva à ativação deste receptor mesmo na ausência de seu ligando, FGF. As mutações deste tipo, que levam ao aumento de uma função *normal*, são conceitual e fisiologicamente bem diferentes daquelas que levam à aquisição de uma propriedade funcional totalmente *nova* pela proteína mutante — mutações de propriedade nova (ver mais adiante).

Mutações que Aumentam a Produção de uma Proteína Normal. Algumas mutações causam doenças pelo aumento da síntese de uma proteína normal nas células nas quais a proteína normalmente está presente. As mutações mais comuns deste tipo devem-se ao aumento da dosagem gênica — a presença de três ou mais cópias de um gene —, o que geralmente resulta da duplicação de parte de um cromossomo ou de todo ele, como ocorre na trissomia do 21 (síndrome de Down). Outro exemplo importante é a degeneração dos nervos periféricos na doença de Charcot-Marie-Tooth tipo IA, que resulta da duplicação de apenas um gene, o gene para a proteína 22 de mielina periférica (*PMP22*). Os aumentos de dosagem gênica também são prevalentes como mutações somáticas nas células cancerosas e podem resultar de cópias aumentadas de parte de um cromossomo ou de todo ele. As mutações deste tipo com mais freqüência contribuem para a progressão de tumores do que para seu início (discutido no Cap. 16).

Mutações de Propriedade Nova

Em algumas doenças importantes, uma mudança na seqüência de aminoácidos causa patologia por conferir uma propriedade nova à proteína, sem necessariamente alterar suas funções normais. O exemplo clássico é a **anemia falciforme** (ver discussão mais adiante), que se deve a uma substituição de aminoácido que *não tem* efeito na habilidade da hemoglobina falcêmica para transportar o oxigênio. Ao contrário da hemoglobina normal, as cadeias de hemoglobina falcêmica agregam-se, quando desoxigenadas, formando fibras poliméricas que deformam as hemácias. Este comportamento não foi observado em nenhuma outra hemoglobina mutante. Não surpreende que estas mutações de propriedade nova sejam raras, pois a maioria das substituições de aminoácidos é neutra ou prejudicial para o funcionamento ou a estabilidade de uma proteína que foi aperfeiçoada pela evolução. Apenas raramente uma mutação introduz uma propriedade nova de significado patológico.

Mutações Associadas à Expressão Gênica Heterocrônica ou Ectópica

Uma classe interessante e importante de mutações são as que alteram as regiões reguladoras de um gene e causam a expressão inadequada do gene em uma época ou em um local anormal. Uma das doenças genéticas mais comuns, o câncer, com freqüência se deve à expressão anormal de um gene que normalmente promove a proliferação celular — um **oncogene** —, nas células nas quais o gene não é normalmente expresso, resultando em malignidade (ver Cap. 16). Comparativamente, algumas mutações nos elementos reguladores levam à expressão continuada no adulto do gene de γ-globina, que é normalmente expresso em níveis altos apenas na vida fetal e não na fase pós-natal. Tais mutações levam a um fenótipo chamado de **persistência hereditária de hemoglobina fetal** (ver discussão mais adiante).

COMO AS MUTAÇÕES PERTURBAM A FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE NORMAIS

Para desenvolver uma proteína biologicamente ativa, a informação deve ser transcrita de uma seqüência de nucleotídeos do gene para o mRNA e então traduzida em um polipeptídeo, que então sofre estágios progressivos de maturação. Mudanças em algumas destas etapas (Quadro 11.1, segunda coluna) decorrentes de alterações no gene estrutural são chamadas de **anomalias primárias**. As anomalias em sete das oito diferentes etapas são ilustradas por várias hemoglobinopatias (ver Quadro 11.1, primeira coluna).

Em alguns casos, a formação de uma proteína final pode depender de eventos modificadores que são mediados por *outras* proteínas ou da associação de uma proteína com outras proteínas (ver o Quadro 11.1, terceira coluna). Quando estes eventos modificadores não ocorrem, a alteração de função deve-se a uma **anomalia secundária** na proteína, como ilustrado nos exemplos mostrados na última coluna do Quadro 11.1. (Muitos destes exemplos serão discutidos no Cap. 12.) Logicamente, quando uma anomalia secundária altera uma proteína em uma doença genética, o defeito primário está no gene estrutural de alguma outra proteína necessária para a modificação.

HEMOGLOBINAS E SUAS DOENÇAS

Os distúrbios das hemoglobinas humanas, chamados de hemoglobinopatias, ocupam uma posição única na genética médica por vários motivos. Eles são de longe as doenças monogênicas mais comuns no mundo e causam uma morbidade substancial. A Organização Mundial de Saúde estima que mais de 5% da população mundial seja portadora de genes para distúrbios de hemoglobina clinicamente importantes. Além disso, como a hemoglobina foi uma das primeiras estruturas proteicas a ser deduzida, e como os genes de globina humana foram os primeiros genes relacionados a doenças a ser clonados, sua patologia molecular e bioquímica talvez seja mais bem compreendida que qualquer outro grupo de doenças genéticas. As globinas também elucidaram processos de evolução tanto no nível molecular quanto no nível populacional e forneceram um modelo de ação gênica durante o desenvolvimento.

Estrutura e Função da Hemoglobina

A hemoglobina é o portador de oxigênio nas hemácias dos vertebrados. A molécula contém quatro subunidades: duas cadeias α e duas cadeias β. Cada subunidade é composta de uma cadeia polipeptídica, a globina, e de um grupo prostético, heme, o qual é um pigmento que contém ferro que se combina com o oxigênio para dar à molécula sua capacidade de transportar oxigênio.

Hemoglobinas Humanas e Seus Genes. A molécula de hemoglobina consiste em duas cadeias de cada um de dois tipos diferentes de polipeptídeos. Na hemoglobina adulta normal (hemoglobina A, ou Hb A), estas cadeias de globina são chamadas de α e β (a estrutura do gene de β-globina é descrita no Cap. 3). As quatro cadeias são dobradas e ajustadas para formar um tetrâmero globular com um peso molecular de aproximadamente 64.500, uma estrutura que, para a Hb A, é abreviada como $\alpha_2\beta_2$. Os dois tipos de cadeias são quase iguais em tamanho, a cadeia de α-globina tendo 141 aminoácidos e a cadeia β, 146. As cadeias assemelham-se muito tanto na seqüência de aminoácidos (estrutura primária) quanto na configuração tridimensional (estrutura terciária). Como as cadeias de α e β-globina são codificadas por genes em loci separados, uma mutação de ponto afeta uma cadeia ou a outra, mas não ambas.

Estudos de Casos Clínicos Ilustrando Fundamentos Genéticos

Estas 29 vinhetas clínicas ilustram os fundamentos genéticos na prática da medicina. Cada vinheta é seguida de uma rápida explicação ou descrição das doenças, sua etiologia e fisiopatologia, seu fenótipo, tratamento e risco de herança. Estas explicações e descrições são baseadas nos conhecimentos e na compreensão atuais. Portanto, como a maioria das coisas na medicina e na ciência, estão sujeitas a refinamento e mudanças à medida que nossos conhecimentos e nossa compreensão evoluírem. A descrição de cada caso usa uma terminologia médica padrão. Os leitores estudantes podem, portanto, precisar consultar um dicionário médico padrão para explicações. Cada vinheta também é seguida de algumas perguntas que pretendem iniciar uma discussão sobre alguns fundamentos genéticos ou clínicos, ou ambos, ilustrados pelo caso. Nem as vinhetas nem as explicações ou descrições seguintes pretendem ser definitivas ou os tratamentos abrangentes de um tópico.

Os casos não pretendem direcionar os cuidados médicos ou estabelecer um padrão de cuidados. São simplesmente ilustrações da aplicação dos fundamentos genéticos à prática da medicina. Embora de um modo geral baseados na experiência clínica, todos os indivíduos e detalhes médicos apresentados são fictícios.

Cornelius F. Boerkoel III, M.D., Ph.D.
Roderick R. McInnes, M.D., Ph.D.
Robert L. Nussbaum, M.D.
Huntington F. Willard, Ph.D.

Apresentação de Casos

1. Acondroplasia
2. Anemia falciforme
3. Câncer hereditário de mama e ovário
4. Câncer hereditário não-polipose do cólon
5. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase
6. Diabetes melito insulino-dependente
7. Diabetes melito não-insulino-dependente
8. Distrofia muscular Duchenne
9. Doença de Alzheimer
10. Doença de Charcot-Marie-Tooth Tipo 1A
11. Doença de Huntington
12. Doença de Tay-Sachs
13. Doença do rim policístico
14. Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas anfractuadas
15. Fibrose cística
16. Hemofilia
17. Hipercolesterolemia familiar
18. Holoprosencefalia (forma não-sindrômica)
19. Leucemia mielóide crônica
20. Polipose adenomatosa familiar
21. Retinoblastoma
22. Reversão sexual
23. Síndrome de Marfan
24. Síndrome de Miller-Dieker
25. Síndrome de Prader-Willi
26. Síndrome de Turner
27. Síndrome do X frágil
28. Talassemia
29. Xeroderma pigmentoso

Acondroplasia

(Mutação FGFR3)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Mutações de ganho de função
- Idade paterna avançada
- Mutação *de novo*

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: pré-natal
- Baixa estatura rizomélica
- Megaencefalia
- Compressão da coluna dorsal

História e Achados Físicos

P.S., uma mulher saudável de 30 anos, estava na 27.ª semana de gestação de seu primeiro filho. Um ultra-som fetal na 26.ª semana de gestação identificou um feto feminino com macrocefalia e rizomelia (encurtamento dos segmentos proximais das extremidades) de todas as extremidades. O marido de P.S. tinha 45 anos de idade e era saudável. Ele tinha três filhos saudáveis de um casamento anterior. Nenhum dos genitores tinha uma história familiar de displasia esquelética, defeitos de nascimento ou distúrbios genéticos. O obstetra explicou aos genitores que seu feto tinha as características da acondroplasia. A menina nasceu após 38 semanas de gestação por cesariana. Ela apresentava as características físicas e radiográficas da acondroplasia, incluindo bossa frontal, megaencefalia, hipoplasia da face média, cifose lombar, extensão limitada do cotovelo, rizomelia, mãos em tridente, braquidactilia e hipotonia. Compatível com suas características físicas, os testes de DNA identificaram uma mutação G1138A no gene de receptor 3 de fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR3*).

Bases

Etiologia da Doença

A acondroplasia, a causa mais comum de nanismo humano, é um distúrbio autossômico dominante causado por mutações específicas em *FGFR3*; duas mutações, G1138A (± 98%) e G1138C (de 1 a 2%), contribuem para mais de 99% dos casos de acondroplasia. A acondroplasia tem uma incidência de 1 em 15.000 a 1 em 40.000 nativivos e afeta todas as raças.

Patogenia

O FGFR3 é um receptor transmembranar de tirosina cinase que liga fatores de crescimento de fibroblasto (FGF). A ligação de FGF ao domínio extracelular de FGFR3 ativa o domínio intracelular de tirosina cinase do receptor e inicia uma cascata de sinais. No osso endocondral, a ativação do FGFR3 inibe a proliferação de condrócitos dentro da placa de crescimento e, assim, ajuda a coordenar o crescimento e a diferenciação de condrócitos com o crescimento e a diferenciação das células genitoras ósseas.

As mutações do *FGFR3* associadas à acondroplasia são mutações de "ganho de função" que causam a ativação independente de ligando de FGFR3. Tal ativação constitutiva de FGFR3 inibe impropriamente a proliferação de condrócitos dentro da placa de crescimento e, conseqüentemente, leva a um encurtamento dos ossos longos, bem como a uma diferenciação anormal de outros ossos.

A guanina 1138 no gene *FGFR3* é um dos nucleotídeos mais mutáveis identificados em qualquer gene humano. A mutação deste nucleotídeo contribui com quase 100% da acondroplasia. Mais de 80 a 90% dos pacientes têm uma mutação *de novo*. As mutações *de novo* da guanina 1138 de *FGFR3* ocorrem exclusivamente na linhagem germinativa paterna e aumentam de freqüência com o avanço da idade paterna (> 35 anos).

Fenótipo e História Natural

Ao nascimento, os pacientes com acondroplasia apresentam um encurtamento rizomélico dos braços e pernas, um tronco relativamente longo e estreito, uma configuração das mãos em tridente e macrocefalia com hipoplasia da face média e uma testa proeminente. Em geral têm um peso de nascimento ligeiramente menor que o normal, embora em alguns casos dentro da faixa normal inferior. Sua altura diminui progressivamente abaixo do normal à medida que crescem.

Em geral, os pacientes têm inteligência normal, embora a maioria tenha um retardo do desenvolvimento motor. Seu retardo do desenvolvimento motor surge de uma combinação de hipotonia, articulações hiperextensíveis (embora os cotovelos tenham extensão limitada de rotação), dificuldade mecânica de equilibrar a cabeça grande e, menos comumente, estenose do canal espinhal com compressão da coluna espinhal.

O crescimento anormal dos ossos faciais e do crânio resulta em hipoplasia da face média, uma pequena base craniana e um pequeno forame craniano. A hipoplasia da face média causa aglomeração dentária, apnéia obstrutiva e otite média. O estreitamento do forame jugular é tido como aumentando a pressão venosa intracraniana, causando, portanto, hidrocefalia. Em cerca de 10% dos pacientes, o estreitamento do *forâmen magnum* em geral causa compressão do tronco cerebral na junção craniocervical e, portanto, um aumento de freqüência de hipotonia, quadriparesia, falta de desenvolvimento, apnéia central e morte súbita. De 3% a 7% dos pacientes morrem inesperadamente durante seu primeiro ano de vida devido à compressão do tronco cerebral (apnéia central) ou apnéia obstrutiva. Outras complicações médicas incluem obesidade, estenose espinhal lombar e *genu varum*.

Tratamento

Suspeito com base nas características clínicas, o diagnóstico da acondroplasia em geral é confirmado por achados radiográficos. Os testes de DNA para as mutações *FGFR3* podem ser úteis em casos ambíguos, mas em geral não são necessários para se fazer o diagnóstico.

Durante a vida, a conduta deve enfocar a antecipação e o tratamento das complicações da acondroplasia. Durante a lactância e início da infância, os pacientes devem ser monitorados quanto à otite média crônica, hidrocefalia, compressão do tronco cerebral e apnéia obstrutiva, tratadas quando necessário. O tratamento dos pacientes com compressão de tronco cerebral pela descompressão de sua junção craniocervical em geral resulta em melhora acentuada da função neurológica. Durante o final da infância e início da vida adulta, os pacientes devem ser monitorados quanto à estenose espinhal sintomática, ao *genu varum* sintomático, à obesidade, às complicações dentárias e à otite média crônica, tratados quando necessário. O tratamento da estenose espinhal em geral requer a descompressão cirúrgica e a estabilização da espinha. A obesidade é difícil de evitar e controlar e, em geral, complica a conduta da apnéia obstrutiva e os problemas articulares e da espinha.

Tanto a terapia com hormônios de crescimento quanto o alongamento cirúrgico das pernas têm sido realizados como tratamentos para a baixa estatura. Ambas as terapias permanecem controversas.

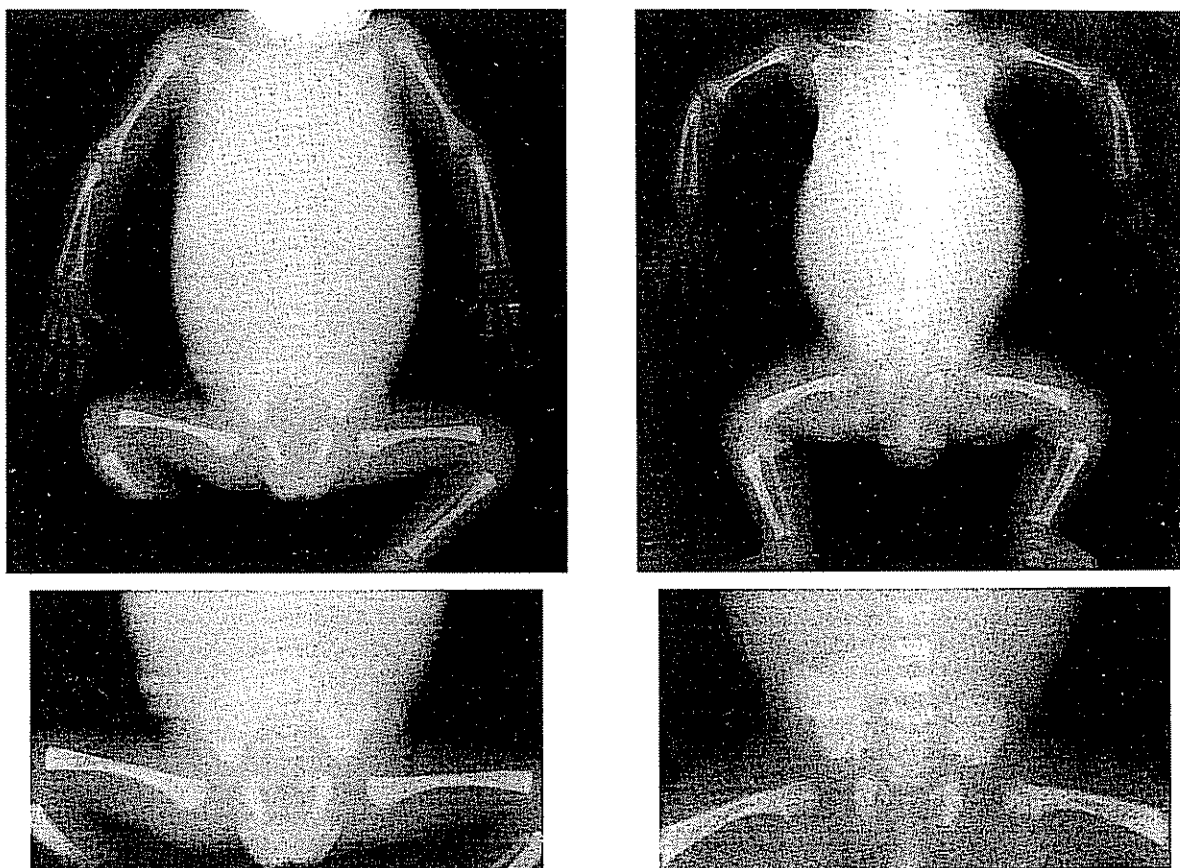



Fig. C.1 Radiografias de um feto normal de 34 semanas (*esquerda*) e um feto de 34 semanas com acondroplasia (*direita*). A comparação das imagens superiores mostra rizomelia e posição em tridente dos dedos no feto com acondroplasia. A comparação das imagens inferiores ilustra o estreitamento caudal da distância interpedicular no feto com acondroplasia *versus* o alargamento interpedicular no feto normal. Além disso, o feto com acondroplasia tem asas ilíacas pequenas, como uma orelha de elefante, e estreitamento da incisura sacrociática. (Cortesia de S. Unger, R. S. Lachman e D. L. Rimoin, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles.)

Além do tratamento de seus problemas médicos, os pacientes em geral necessitam de ajuda no que diz respeito ao ajuste social tanto em função dos aspectos psicológicos de sua aparência e baixa estatura quanto em função de suas limitações físicas. Os grupos de apoio em geral ajudam a fornecer interação com pessoas similarmente afetadas e programas sociais.

Risco de Herança

Para genitores normais com um filho afetado por acondroplasia, o risco de recorrência em sua futura prole é muito baixo, embora seja mais alto que o risco da população geral por causa de um possível mosaicismo de linhagem germinativa. Para parentescos nos quais um genitor é afetado por acondroplasia, o risco de recorrência em cada criança é de 50%, pois a acondroplasia é um distúrbio autossômico dominante com penetrância completa. Para famílias em que ambos os genitores são afetados, cada filho tem um risco de 50% de ter acondroplasia, um risco de 25% de ter acondroplasia homozigota letal e uma chance de 25% de ter estatura normal.

O diagnóstico pré-natal antes da 20.ª semana de gestação só está disponível por testes moleculares do DNA fetal, embora o diagnóstico possa ser feito tardiamente na gestação pela análise radiográfica do esqueleto fetal. As características da acondroplasia não podem ser detectadas por ultra-som pré-natal antes de 24 semanas de gestação, enquanto a displasia tanatofórica grave pode ser detectada mais cedo (Fig. C.1).

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Cite outros distúrbios que aumentam de freqüência com o aumento da idade paterna. Que tipos de mutações estão associados a estes distúrbios?
2. Discuta os possíveis motivos pelos quais as mutações de *FGFR3* G1138A e G1138C surgem exclusivamente durante a espermatogênese.
3. A síndrome de Marfan, a doença de Huntington e a acondroplasia surgem todas como um resultado de mutações dominantes de ganho de função. Compare e contraste os mecanismos patológicos destas mutações de ganho de função.
4. Além da acondroplasia, as mutações de ganho de função do *FGFR3* estão associadas à hipocondrodisplasia e à displasia tanatofórica. Explique como a gravidade fenotípica destes três distúrbios está correlacionada com o nível da atividade da tirosina cinase FGFR3.

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Anemia Falciforme

(Mutação de β-Globina Val6Glu)

Autossômica Recessiva

Fundamentos

- Vantagem de heterozigotos
- Mutação com nova propriedade
- Composto genético
- Variação étnica em freqüências alélicas

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância
- Anemia
- Infarto
- Asplenia

História e Achados Físicos

Pela segunda vez em 6 meses, um casal do Caribe trouxe sua filha de 24 meses de idade, C W., ao departamento de emergência por ela não conseguir se sustentar sobre os pés Não havia história de febre, infecção ou trauma e, sob outros aspectos, sua história médica era normal. Os achados da visita prévia haviam sido normais, exceto por um nível baixo de hemoglobina e um baço levemente aumentado Os achados do exame físico eram normais, exceto pela ponta do baço palpável e os pés inchados Seus pés eram muito sensíveis à palpação, e ela se recusava a sustentar seu peso Ambos os pais tinham irmãos que morreram na infância por infecções e outros que podiam ter tido anemia falciforme Em vista desta história e do inchaço doloroso e recorrente de seus pés, os médicos testaram C W para anemia falciforme por eletroforese de hemoglobina O resultado do teste documentou a hemoglobina falcêmica em C W

Bases

Etiologia da Doença

A anemia falciforme é um distúrbio autossômico recessivo da hemoglobina, no qual os genes da subunidade β têm uma mutação de mudança de sentido causando a substituição de glutamina por valina no sexto aminoácido A doença é comumente devida à homozigose para a mutação falcêmica, embora compostos genéticos entre o alelo falcêmico e uma hemoglobina C ou um alelo de talassemia β também possam ter a doença A prevalência da doença falciforme varia amplamente nas populações em proporção à exposição atual e passada à malária (Quadro) A mutação falciforme parece ter evoluído porque confere alguma resistência à malária e, portanto, uma vantagem de sobrevida a pessoas heterozigotas para a mutação

Freqüências da Mutação Falciforme entre Neonatos na Califórnia

Etnicidade	Hb SS	Hb AS
Afro-americanos	1/700	1/14
Índios asiáticos	0/1.600	1/700
Hispânicos	1/46 000	1/180
Oriente Médio	0/22 000	1/360
Nativos americanos	1/17.000	1/180
Caucasianos	1/160 000	1/600
Asiáticos	0/200 000	1/1.300

Patogenia

A hemoglobina é composta de quatro subunidades, duas alfa e duas beta (ver Cap. 11). A mutação Val6Glu na globina β diminui a solubilidade da hemoglobina desoxigenada e faz com que ela forme uma estrutura gelatinosa de polímeros fibrosos que ficam rígidos e distorcem a célula, isto é, células falciformes (Fig. C.2) Estes eritrócitos falcêmicos ocluem os capilares e causam infartos Inicialmente, a oxigenação faz com que polímeros de hemoglobina se dissolvam e o eritrócito volte à sua forma normal e plasticidade. Entretanto, o repetido afoiçamento e volta ao normal produzem células irreversivelmente falcêmicas que são removidas da circulação A remoção de eritrócitos da circulação excede a capacidade de produção da medula e causa anemia hemolítica.

Fenótipo e História Natural

Os pacientes com doença falciforme em geral se apresentam nos primeiros 2 anos de vida com anemia, falta de desenvolvimento, esplenomegalia, infecções repetidas e dactilite (tumefação dolorosa das mãos e dos pés pela oclusão dos capilares nos ossos pequenos) Os infartos vasooclusivos ocorrem em muitos tecidos, causando derrames, "síndrome torácica aguda", necrose papilar renal, "auto-esplenectomia", úlceras nas pernas, priapismo, necrosse óssea asséptica e perda visual. A vasooclusão óssea causa "crises" dolorosas e, se não forem tratadas, estas "crises" podem persistir por dias ou semanas A asplenia funcional, do infarto e de outros fatores pouco compreendidos, aumenta a suscetibilidade a infecções bacterianas, tais como sepse pneumocócica e osteomielite por *Salmonella* A infecção é uma causa importante de morte em todas as idades, embora uma insuficiência renal e pulmonar progressiva também cause comumente a morte na quarta ou quinta décadas de vida. Os pacientes também têm um alto risco de desenvolver uma anemia aplástica ameaçadora da vida após uma infecção de parvovírus, pois esta causa uma parada temporária na produção de eritrócitos

Em contraste com a anemia falciforme, o traço falcêmico, visto nos heterozigotos para a mutação, não é acompanhado de anemia e, em geral, é clinicamente silencioso Sob condições de anoxia grave, tal como ir a grandes altitudes, entretanto, os eritrócitos dos pacientes com traço falcêmico podem afoiçar e causar sintomas similares aos observados na doença falciforme

Tratamento

Em um determinado paciente com doença falciforme, não existem previsões precisas quanto à gravidade do curso da doença Embora a base molecular desta doença já seja conhecida há mais tempo que qualquer outro defeito genético, os tratamentos atuais são apenas de apoio. Nenhuma terapia específica que evite ou reverta o processo de afoiçamento *in vivo* foi identificada Embora a terapia gênica tenha o potencial de melhorar e curar esta doença (ver Cap. 13), a transferência gênica efetiva não foi obtida. O transplante alogênico de medula óssea é o único tratamento atualmente disponível que pode curar a anemia falciforme

Risco de Herança

Como a anemia falciforme é um distúrbio autossômico recessivo, os futuros irmãos de uma criança afetada têm um risco de 25% de anemia falciforme e um risco de 50% de traço falcêmico Usando DNA fetal obtido de vilosidades coriônicas ou amniócitos, é possível o diagnóstico pré-natal por análise molecular da mutação falcêmica

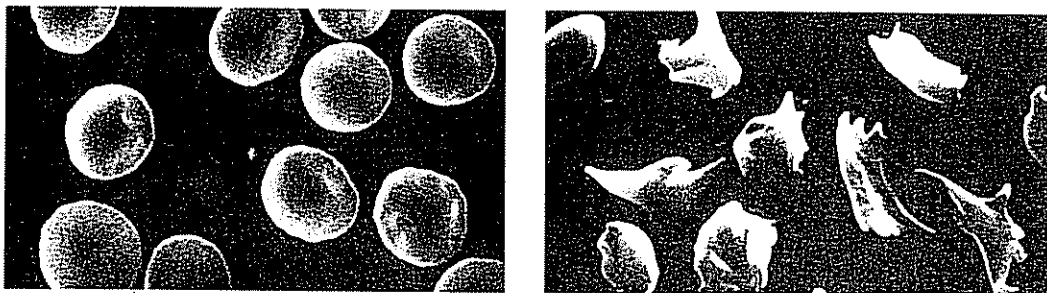



Fig. C.2 Uma micrografia eletrônica de varredura de hemácias de um paciente com anemia falciforme A forma afoiçada clássica só é produzida quando as células estão em estado desoxigenado (*direita*) As células oxigenadas estão à *esquerda* (De Kaul D K. Fabry M E. Windisch P. *et al* [1983] J Clin Invest 72:22, com permissão)

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1 Quais as dificuldades da terapia gênica para este distúrbio?

2. Cite duas outras doenças que podem ter se tornado prevalentes devido à vantagem de sobrevida do heterozigoto. Qual a justificativa para a hipótese da vantagem dos heterozigotos para estas doenças?

3. Embora seja sempre uma doença grave, a severidade da anemia falciforme é determinada parcialmente pelo haplótipo no qual ocorre a mutação. Como o haplótipo pode afetar a gravidade da doença?

4 Usando os dados de incidência do quadro, qual o risco que uma mulher e um homem afro-americanos não-aparentados têm de ter um filho afetado pela anemia falciforme? E com traço falcêmico?

Referências

Reed W, Vichinsky EP (1998) New considerations in the treatment of sickle cell disease. Annu Rev Med 49:461-474.

Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG (2001) The hemoglobinopathies. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 4571-4636.

Câncer Hereditário de Mama e Ovário

(Mutação BRCA1 ou BRCA2)

Autossômico Dominante

Fundamentos

- Gene supressor tumoral
- Carcinogênese em várias etapas
- Mutação somática
- Penetrância incompleta
- Expressividade variável
- Efeito do fundador

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: adulta
- Câncer de mama
- Câncer ovariano
- Câncer de próstata
- Cânceres primários múltiplos

História e Achados Físicos

S M , uma mulher de 27 anos antes saudável, foi encaminhada a uma clínica de genética do câncer por seu ginecologista após ter diagnosticado um câncer de mama. Ela estava preocupada com o risco dos filhos desenvolverem câncer e com o seu risco de desenvolver câncer ovariano Sua mãe, duas tias maternas e o avô materno tinham câncer de mama Sua mãe também tinha tido câncer ovariano (Fig. C.3) Os achados do exame físico de S.M. eram marcantes apenas por uma cicatriz em seu seio direito O consultor genético explicou que a história familiar de câncer de mama era indicativa de uma predisposição hereditária. Com base na discussão que seguiu de prognóstico e riscos de recorrência, S.M. decidiu fazer um seqüenciamento de DNA para os genes de suscetibilidade ao câncer de mama *BRCA1* e *BRCA2*. Estes testes mostraram que ela possuía uma mutação na linhagem germinativa em um dos alelos de *BRCA2* Durante a discussão dos resultados, S.M. pediu que suas filhas de 6 e 7 anos fossem testadas. O consultor genético explicou que a decisão de fazer o teste genético seria melhor se fosse deixada para quando as crianças fossem maduras o suficiente para decidir sobre a utilidade de tais testes Cinco parentes adultos decidiram fazer o teste preditivo, e descobriu-se que quatro eram portadores da mutação Uma destas quatro pessoas fez uma mastectomia bilateral profilática e a outra fez uma salpingo-ooforectomia bilateral profilática

Base

Etiologia da Doença

As mutações dos principais genes de predisposição ao câncer contribuem para 3% a 10% dos casos de câncer de mama e têm uma preva-

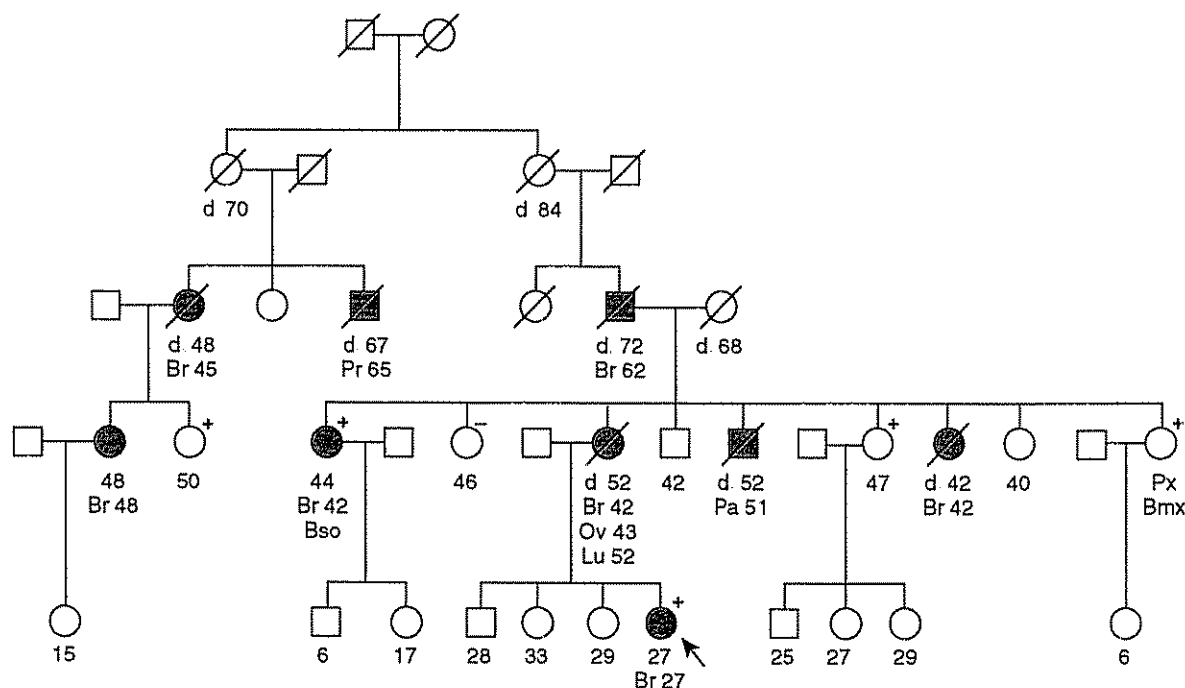



Fig. C.3 Segregação familiar de uma mutação *BRCA2* C3590G. Notar a ocorrência freqüente de câncer de mama, incluindo o masculino Notar a penetrância incompleta nas gerações I e II O probando, S M , é indicado por uma seta Os símbolos vermelhos indicam um diagnóstico de câncer As idades são mostradas diretamente abaixo do símbolo Um "+" identifica os portadores da mutação *BRCA2* e um "−" os não portadores, como determinado pelo seqüenciamento do DNA Os diagnósticos de câncer são seguidos da idade de diagnóstico Abreviações de câncer: Br = mama; Ov = ovariano; Lu = pulmão; Pa = pancreático; Pr = próstata. Outras abreviações: Bso = salpingo-ooforectomia bilateral; d = idade de morte; Px Bmx = mastectomia bilateral profilática (Cortesia de A Liede e S Narod, Women's College Hospital e University of Toronto)

População	Risco Cumulativo aos 70 Anos (%)			
	Mulheres		*Homens*	
	Câncer de Mama	Câncer Ovariano	Câncer de Mama	Câncer de Próstata
Portadores da mutação *BRCA1*	40-87	16-63	?	25
Portadores da mutação *BRCA2*	28-84	27	6-14	20
População geral	8-10	1,5	<0,1	10

lência geral estimada de 1 em 300 a 1 em 800. Dois destes genes são o *BRCA1* e *BRCA2*. Na população norte-americana geral, a prevalência das mutações em *BRCA1* está entre 1 em 500 e 1 em 1.000. A prevalência de mutações em *BRCA2* não está definida. As mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* contribuem com cerca de 70% a 80% do câncer de mama **familiar**.

Patogenia

BRCA1 e *BRCA2* codificam proteínas nucleares ubiquamente expressas que são tidas como mantendo a integridade genômica por regular o reparo do DNA, a transativação transcricional e o ciclo celular. Muitas observações experimentais sugerem que *BRCA1* e *BRCA2* atuam na mesma via.

A despeito da expressão ubíqua de *BRCA1* e *BRCA2*, a mutação destes genes predispõe predominantemente a neoplasias de mama e ovário. É provável que perda de função de *BRCA1* e *BRCA2* permita o acúmulo de outras mutações que são diretamente responsáveis pela neoplasia. Compatível com esta hipótese, os carcinomas de mama e ovário de pacientes com mutações de *BRCA1* ou *BRCA2* têm instabilidade cromossômica e freqüentes mutações em outros genes supressores tumorais.

A formação de tumores em portadoras de mutações na linhagem germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2* segue a hipótese de "dois eventos", isto é, ambos os alelos de *BRCA1* ou de *BRCA2* perdem a função nas células tumorais (ver Cap. 16). A perda somática de função pelo segundo alelo ocorre por perda de heterozigose, mutação intragênica ou hipermetilação do promotor. Devido à alta freqüência com a qual o segundo alelo de *BRCA1* ou *BRCA2* perde a função, as famílias que segregam uma mutação germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam herança autossômica dominante da neoplasia.

A prevalência populacional de mutações germinativas de *BRCA1* ou *BRCA2* varia muito e em geral sugere um efeito do fundador. Na Islândia, a mutação *BRCA2* 999del5 ocorre em um haplótipo específico e tem uma prevalência de 0,6%. Entre os judeus Ashkenazi, as mutações *BRCA1* 185delAG e 5382insC, bem como a mutação *BRCA2* 6174delT, também ocorrem em haplótipos específicos e têm prevalências de 1%, 0,4% e 1,2%, respectivamente.

Fenótipos e História Natural

Os pacientes com mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* têm um risco aumentado de vários cânceres. Além do risco aumentado de câncer ovariano e de mama feminina, as mutações em *BRCA1* conferem um aumento de risco de câncer de próstata e, possivelmente, câncer de cólon. Similarmente, além do câncer ovariano e feminino de mama, as mutações germinativas em *BRCA2* aumentam o risco de cânceres de próstata, pancreático, dutos biliares, vesícula e mama masculina.

Entre as mulheres portadoras de mutação germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2*, a penetrância geral de câncer de mama ou ovariano, ou ambos, é estimada como sendo de cerca de 50% a 80%. Aproximadamente dois terços das famílias com uma história de câncer de mama e ovário segregam uma mutação de *BRCA1*, enquanto cerca de dois terços das famílias com uma história de câncer de mama masculino ou feminino segregam uma mutação em *BRCA2*.

Os pacientes com mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* e câncer de mama ou ovário, ou ambos, têm resultados e prognósticos similares aos dos pacientes com câncer esporádico de mama e ovário. O prognóstico é amplamente determinado pelo estágio do tumor. Em contraste com os pacientes com carcinomas esporádicos de mama, entretanto, os pacientes com mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* em geral têm carcinomas de mama que são de grau maior e que são estrógeno-receptor negativo.

Tratamento

As recomendações atuais para mulheres com mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* de linhagem germinativa incluem exames freqüentes de mamas e ovários, bem como estudos de imagens. Infelizmente, os métodos atuais de triagem para câncer ovariano não têm aumentado a sobrevida. A conduta de homens em risco inclui freqüentes exames de próstata e mamas e testes laboratoriais para evidência de câncer de próstata. Nas famílias com mutações conhecidas de linhagem germinativa, a análise molecular pode enfocar a vigilância ou profilaxia nos membros portadores de uma mutação. A mastectomia bilateral total pode reduzir o risco de câncer de mama em mais de 90%, embora o risco não seja abolido, pois em geral ainda resta parte do tecido mamário. Similarmente, a salpingo-ooforectomia bilateral pode reduzir o risco de câncer ovariano em mais de 90%. Os estudos da quimioprevenção do câncer de mama usando antagonistas de estrógenos e anticoncepcionais orais estão em andamento.

Risco de Herança

O sexo feminino, a idade e a história familiar são os fatores de risco mais importantes para o câncer de mama. Nas populações ocidentais, a incidência cumulativa de câncer de mama feminino é de 1 em 200 aos 40 anos, de 1 em 50 aos 50 anos e de 1 em 10 aos 70 anos. Se as pacientes tiverem um parente em primeiro grau no qual o câncer de mama desenvolveu-se após os 55 anos, elas terão um risco relativo de 1,6 de câncer de mama, enquanto o risco relativo aumentará para 2,3 se o câncer de mama tiver se desenvolvido no membro familiar antes dos 55 anos e para 3,8 se tiver se desenvolvido antes dos 45 anos. Se o parente em primeiro grau teve câncer de mama bilateral, o risco relativo é de 6,4.

A prole de pacientes com uma mutação germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2* tem um risco de 50% de herdar esta mutação. Devido a uma penetrância incompleta e expressividade variável, o desenvolvimento e o início do câncer não podem ser previstos com precisão.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Em que idade e sob quais condições os testes de uma criança em risco são apropriados?
2. Qual o risco de um filho desenvolver câncer de próstata quando um genitor possui uma mutação germinativa em *BRCA1*? Uma mutação germinativa em *BRCA2*?
3. Atualmente, o seqüenciamento da região codificante de *BRCA1* detecta apenas de 60% a 70% das mutações em famílias com ligação para o gene. Que mutações o seqüenciamento perderia? Como deveria ser interpretado um relato de "nenhuma mutação detectada pelo seqüenciamento" e usado na informação genética? Como o teste de um membro de uma família afetada esclarece os resultados do teste?

Referência

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Câncer Hereditário Não-polipose do Cólon

(Mutações Gênicas de Reparo de DNA Pareado Errado)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Genes de suscetibilidade a tumor
- Carcinogênese em várias etapas
- Mutação somática
- Instabilidade de microssatélite
- Expressividade variável
- Penetrância incompleta

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: vida adulta média
- Câncer colorretal
- Cânceres primários múltiplos

História e Achados Físicos

P.P., uma banqueira de 38 anos mãe de três filhos, foi encaminhada a uma clínica de genética do câncer por seu médico para obter informações sobre sua história familiar de câncer. Seu pai, seu irmão, um sobrinho e uma sobrinha, um tio paterno e a avó paterna haviam desenvolvido câncer colorretal com as idades de 47, 46, 40, 35, 80 e 40 anos, respectivamente. Além disso, uma irmã havia tido câncer colorretal aos 26 anos e câncer endometrial aos 43 anos. Um tio paterno desenvolvera câncer endometrial aos 38 anos, e outra tia paterna desenvolvera câncer de ovário aos 44 anos. P.P. não tinha uma história de problemas médicos ou cirúrgicos. Os achados de seu exame físico eram normais. O geneticista explicou a P.P. que sua história familiar era sugestiva de câncer hereditário não-polipose do cólon (HNPCC) e que o modo mais eficiente e efetivo para determinar a causa genética do HNPCC em sua família era por meio do teste molecular de um membro vivo afetado. Após alguma discussão com sua sobrinha, o único membro familiar afetado vivo, P.P. e sua sobrinha voltaram à clínica para os testes. O teste de uma amostra arquivada do tumor do cólon da sobrinha identificou uma instabilidade de microssatélite e, subseqüentemente, uma mutação germinativa em *MLH1*. P.P. não tinha a mutação. Portanto, o geneticista disse que o seu risco e o de seus filhos de desenvolver câncer era similar ao da população em geral. Seu irmão não-afetado tinha a mutação e continuou a fazer uma colonoscopia anual. O tio paterno que desenvolvera câncer colorretal aos 80 anos não tinha a mutação.

Bases

Etiologia da Doença

Pelo menos 50% das pessoas nas populações ocidentais desenvolvem um tumor colorretal por volta dos 70 anos e cerca de 10% destas pessoas eventualmente desenvolvem câncer colorretal. O HNPCC é uma síndrome de predisposição ao câncer autossômica dominante geneticamente heterogênea que em geral é causada por mutações no reparo de genes pareados errados. O HNPCC tem uma prevalência de 2 a 5 por 1.000 e contribui com cerca de 3% a 8% do câncer colorretal.

Patogenia

Na maioria dos cânceres colorretais, incluindo a polipose adenomatosa familiar, o cariótipo torna-se progressivamente mais aneuplóide (ver Cap. 16). Cerca de 13% a 15% dos cânceres colorretais não têm tal instabilidade cromossômica, mas sim uma inserção ou deleção em seqüências repetitivas (instabilidade de microssatélites). A instabilidade de microssatélites ocorre em 85% a 90% dos tumores de HNPCC. Compatível com esta observação, cerca de 70% das famílias com HNPCC que têm carcinoma exibindo instabilidade de microssatélite têm mutações germinativas em um dos seis genes de reparo de DNA pareado errado: *MSH2, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1* ou *PMS2*.

O reparo de replicação errada do DNA reduz os erros de replicação em 1.000 vezes. Os erros de síntese de DNA causam um pareamento errado e deformam a dupla hélice de DNA. MutSα, um heterodímero de MSH2 e MSH6, liga-se a estas deformações, e MutLα, um heterodímero de MLH1 e PMS2, liga-se a MutSα e identifica o filamento de DNA recém-sintetizado. Este complexo proteico então recruta outras enzimas para efetuar o reparo. Usando o processo de excisão de trecho longo, este complexo excisa o fragmento incorreto do DNA recém-sintetizado e então o ressintetiza.

Ambos os alelos de um gene de reparo de pareamento errado de DNA devem perder a funcionalidade para causar uma instabilidade de microssatélite. A alta freqüência de perda de função somática no segundo alelo define o HNPCC como uma doença autossômica dominante com aproximadamente 80% de penetrância. Esta perda somática de função pode ocorrer por mutação de perda de heterozigose intragênica ou hipermetilação.

No HNPCC, um número crescente de loci de microssatélites muta durante a progressão de adenoma para carcinoma. A inativação dos genes contendo seqüências microssatélites pode ter papéis importantes na progressão tumoral. Por exemplo, a instabilidade de microssatélites induz mudanças de matriz de leitura no gene II do receptor do fator de crescimento transformante (*TGFBR2*). As mutações no *TGFBR2* causam a perda de expressão de TGFβRII, e como o sistema TGFβ inibe o crescimento das células epiteliais colônicas, sua perda permite escapar do controle de crescimento. Em apoio ao papel de *TGFBR2* no HNPCC, uma família afetada sem as mutações em um gene de reparo de pareamento errado de DNA tem uma mutação germinativa em *TGFBR2*. As mutações *TGFBR2* ocorrem nas lesões iniciais de HNPCC e podem ser responsáveis pelo crescimento de adenomas.

Fenótipo e História Natural

Embora os pacientes com HNPCC desenvolvam pólipos similares em número aos da população geral, eles os desenvolvem mais jovens. Sua média de idade ao diagnóstico de adenocarcinoma colorretal é de menos que 50 anos, ou seja, de 10 a 15 anos mais jovens que a população geral (Fig. C.4). Os pacientes com HNPCC e uma mutação definida de linhagem germinativa têm um risco de 80% ao longo da vida de desenvolver câncer colorretal. De 60% a 70% dos adenomas colônicos e carcinomas ocorrem proximais à flexão esplênica.

Em adição ao câncer colorretal, os cânceres associados ao HNPCC incluem o câncer de estômago, do intestino delgado, do pâncreas, dos rins, do endométrio e dos ovários. Os cânceres de pulmão e mamas não estão associados ao HNPCC (ver Fig. C.4). Os pacientes com HNPCC e uma mutação definida germinativa têm um risco de mais de 90% de desenvolver câncer colorretal ou um destes cânceres associados, ou ambos. A penetrância variável e a expressividade do HNPCC provavelmente dependem tanto da composição genética quanto do ambiente.

Comparado com pacientes com polipose adenomatosa familiar ou tumores colorretais com instabilidade cromossômica, os pacientes com HNPCC têm um prognóstico melhor, quando ajustados por estágio e idade. O mecanismo subjacente a estas observações não é compreendido.

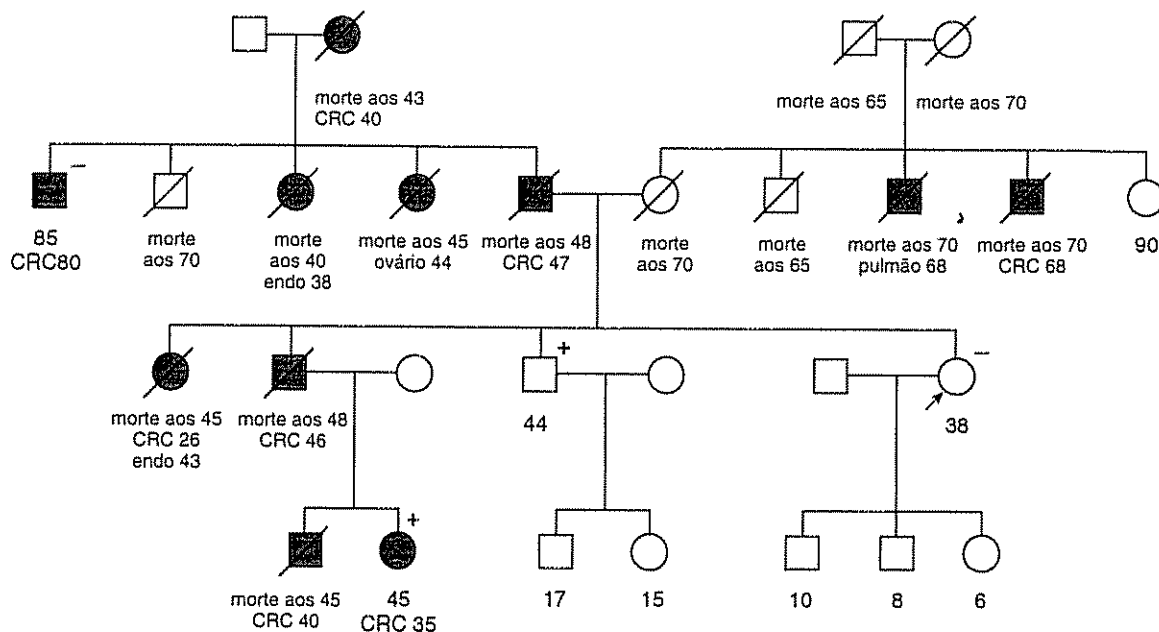



Fig. C.4 Uma família segregando uma mutação *MLH1*. Notar a ocorrência freqüente de câncer de cólon, bem como de outros cânceres associados ao HNPCC, tais como o câncer endometrial, o câncer pancreático e o câncer ovariano. Notar que apenas um membro da família tinha cânceres colorretais e do endométrio e outro tinha câncer de cólon esporádico (com teste negativo para a mutação familiar). O probando é indicado por uma *seta*. Os símbolos escuros indicam um diagnóstico de câncer. As idades são mostradas diretamente abaixo dos símbolos. Um sinal "+" identifica portadores da mutação *MLH1* e um "−" identifica não-portadores. Os diagnósticos de câncer foram seguidos das idades de diagnóstico. Abreviações de câncer: CRC = câncer colorretal; endo = câncer endometrial; ovário = câncer ovariano; pulmão = câncer pulmonar. (Cortesia de T. Pal e S. Narod, Women's College Hospital e University of Toronto.)

Tratamento

A história familiar define o HNPCC. Os pacientes não têm características físicas distintivas. O critério necessário para identificar os pacientes está evoluindo à medida que o diagnóstico de HNPCC desloca-se das pequisas para a área clínica. O reconhecimento precoce do HNPCC é necessário para uma intervenção efetiva. A vigilância com colonoscopia do cólon proximal começando aos 25 anos aumenta a expectativa de vida em 13,5 anos e a proctocolectomia aos 25 anos aumenta o tempo de vida em 15,6 anos. As biópsias de vigilância endometrial e as ultra-sonografias abdominais para as mulheres em risco não provaram ser medidas preventivas efetivas. Nas famílias com mutações germinativas conhecidas, a identificação da mutação gênica de reparo de pareamento errado de DNA pode enfocar a vigilância nos genitores que possuem a mutação, mas, nas famílias com HNPCC sem uma mutação germinativa identificada, a ausência de uma mutação não exclui a necessidade de vigilância freqüente.

Risco de Herança

O risco empírico da população ocidental geral de desenvolver câncer colorretal é de 5% a 6%. Este risco é acentuadamente modificado pela história familiar. Os pacientes com um parente de primeiro grau com câncer colorretal têm um risco relativo de 1,7. Este risco relativo aumenta para 2,75 se dois ou mais parentes em primeiro grau tiverem câncer colorretal. Se um parente afetado em primeiro grau tiver desenvolvido câncer colorretal antes dos 44 anos de idade, o risco relativo aumenta para mais de 5.

Em contraste, um paciente com uma mutação germinativa em um gene de reparo de pareamento errado de DNA tem um risco de 50% de ter um filho com uma mutação de linhagem germinativa, e cada filho tem um risco de câncer de cerca de 45%. O diagnóstico pré-natal não é rotina, mas teoricamente é possível, se a mutação germinativa tiver sido identificada no genitor. Devido à penetrância incompleta e à variação na expressividade, a gravidade e o início do HNPCC e a ocorrência de cânceres associados não podem ser previstos.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Compare os mecanismos de tumorigênese nos distúrbios de reparo de excisão de nucleotídeos, instabilidade cromossômica e instabilidade de microssatélites.
2. Como um paciente com uma história familiar de HNPCC deve ser informado se o teste para erro de reparo de pareamento de DNA for positivo? E se for negativo?
3. Discuta a ética dos testes para HNPCC em menores.

Referências

Boland CR (2001) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 769–783.

Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87:159–170.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature 396:643–649.

Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

(Mutação G6PD)

Ligada ao X

Fundamentos

- Vantagem do heterozigoto
- Farmacogenética

Principais Características Fenotípicas

- Idade de manifestação: neonatal
- Anemia hemolítica
- Icterícia neonatal

História e Achados Físicos

Em um calmo final de tarde de verão, L.M., um menino de 5 anos antes saudável, apresentou-se na emergência com febre, pálido, com taquicardia, taquipnéia e respondendo minimamente. Sob outros aspectos, os achados de seu exame físico eram normais. Na manhã anterior à apresentação, ele estava com boa saúde, mas durante a tarde desenvolveu dor abdominal, dor de cabeça e febre. No fim da tarde ele estava com taquipnéia e incoerente. Ele não tinha ingerido nenhuma medicação ou toxina conhecida, e os resultados da triagem toxicológica da urina foram negativos. Os resultados de outros testes laboratoriais mostraram uma intensa hemólise não-imune intravascular e hemoglobinúria. Após a ressuscitação, L.M. foi internado no hospital. A hemólise resolveu-se sem outra intervenção. L.M. era de origem grega. Seus pais não tinham conhecimento de história familiar de hemólise, embora sua mãe tivesse alguns primos na Europa com um "problema sanguíneo". Uma investigação posterior revelou que, na manhã anterior à internação, L.M. tinha comido feijões de fava no jardim enquanto sua mãe estava trabalhando no quintal. O médico explicou aos genitores que L.M. provavelmente tinha deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e por causa disso tinha ficado doente após ingerir fava. A dosagem subseqüente da atividade eritrocitária de G6PD de L.M. confirmou que ele tinha deficiência de G6PD. Os genitores foram informados quanto ao risco de L.M. fazer uma hemólise aguda após a exposição a algumas drogas e toxinas e receberam uma lista de compostos que L.M. deveria evitar.

Fundamentos

Etiologia da Doença

A deficiência de G6PD, uma predisposição hereditária à hemólise, é um distúrbio ligado ao X de hemostasia antioxidante que é causado por mutações no gene de *G6PD*. Em áreas nas quais a malária é endêmica, a deficiência de G6PD tem uma prevalência de 5% a 25%, enquanto nas áreas não-endêmicas tem uma prevalência de menos de 0,5% (Fig. C.5). Como na anemia falciforme, a deficiência de G6PD parece ter atingido uma freqüência substancial em algumas áreas porque confere aos indivíduos heterozigotos para a deficiência de G6PD alguma resistência à malária e, portanto, uma vantagem de sobrevida (ver Cap. 12).

Patogenia

A G6PD é a primeira enzima na derivação de hexose monofosfato, uma via crucial para gerar nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A NADPH é necessária para a regeneração do glutatião reduzido. Dentro dos eritrócitos, o glutatião reduzido é usado para a detoxificação dos oxidantes produzidos pela interação de hemoglobina e oxigênio e por fatores exógenos tais como drogas, infecção e acidose metabólica.

A maioria das deficiências de G6PD surge porque as mutações no gene *G6PD* ligado ao X diminuem a atividade catalítica ou a estabilidade de G6PD, ou ambas. Quando a atividade de G6PD é suficientemente depletada ou deficiente, não há NADPH suficiente para regenerar o glutatião reduzido durante as ocasiões de estresse oxidativo. Isto resulta na oxidação e na agregação de proteínas intracelulares (corpos de Heinz) e na formação de eritrócitos rígidos que prontamente sofrem hemólise.

Com os alelos mais comuns de *G6PD*, que tornam a proteína instável, a deficiência de G6PD nos eritrócitos piora à medida que os eritrócitos envelhecem. Como os eritrócitos não têm núcleo, um novo mRNA de G6PD não pode ser transcrito. Assim, os eritrócitos são incapazes de substituir a G6PD à medida que ela é degradada. Durante a exposição a um episódio de estresse oxidativo, portanto, a hemólise começa com os eritrócitos mais velhos e progressivamente envolve os mais novos, dependendo da gravidade do estresse oxidativo.

Fenótipo e História Natural

Como um distúrbio ligado ao X, a deficiência de G6PD afeta predominante e mais gravemente os homens. Raras mulheres sintomáticas têm um desvio de inativação do cromossomo X, de modo que o X portador do alelo da doença de *G6PD* é o cromossomo X ativo nos precursores de eritrócitos.

Além do sexo, a gravidade da deficiência de G6PD depende da mutação específica de *G6PD*. Em geral, a mutação comum no Mediterrâneo (G6PD B^- ou mediterrânea) tende a ser mais grave que as mutações comuns na África (variantes G6PD A^-) (ver Fig. C.5). Nos eritrócitos dos pacientes com a variante do Mediterrâneo, a atividade de G6PD diminui para níveis insuficientes de 5 a 10 dias depois de os eritrócitos aparecerem na circulação, enquanto nos eritrócitos dos pacientes com as variantes G6PD A^- a atividade de G6PD diminui para níveis insuficientes de 50 a 60 dias depois de os eritrócitos aparecerem na circulação. Portanto, a maioria dos eritrócitos é suscetível de hemólise nos pacientes com as formas graves de deficiência de G6PD, tal como a G6PD mediterrânea, mas apenas de 20% a 30% são suscetíveis nos pacientes com as variantes G6PD A^-.

A deficiência de G6PD manifesta-se mais comumente seja como icterícia neonatal ou anemia hemolítica aguda. O pico de incidência da icterícia neonatal ocorre durante os segundo e terceiro dias de vida. A gravidade da icterícia varia de subclínica a níveis compatíveis com sua intensidade. A anemia associada raramente é grave. Os episódios de anemia hemolítica aguda em geral começam algumas horas depois de um estresse oxidativo e terminam quando os eritrócitos deficientes de G6PD foram lisados. Portanto, a gravidade da anemia associada a estes episódios agudos hemolíticos é proporcional à deficiência de G6PD e ao estresse oxidativo. As infecções virais e bacterianas são os ativadores mais comuns, mas muitas drogas e toxinas também podem precipitar a hemólise. O distúrbio favismo resulta de hemólise secundária à ingestão de uma espécie de feijão pelos pacientes, com as formas mais graves de deficiência de G6PD, tal como a G6PD mediterrânea. A fava contém β-glicosídios, oxidantes de ocorrência natural.

Além da icterícia neonatal e da anemia hemolítica aguda, a deficiência de G6PD causa, em casos raros, anemia hemolítica não-esferocítica crônica ou congênita. Os pacientes com anemia hemolítica não-esferocítica crônica em geral têm uma profunda deficiên-

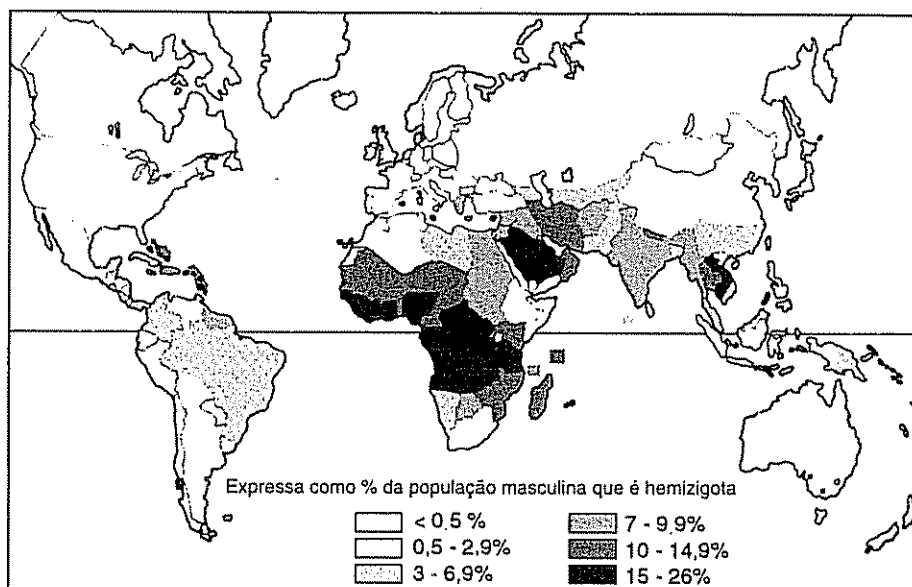



Fig. C.5 Distribuição mundial da deficiência de G6PD As freqüências de homens deficientes de G6PD nos vários países são também as freqüências dos alelos, pois o gene é ligado ao X. (Redesenhado de WHO Working Group |1989| Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Bull WHO 67:601, com permissão.)

cia de G6PD, que causa uma grave anemia e um aumento da suscetibilidade à infecção. A suscetibilidade à infecção surge porque o suprimento de NADPH dentro dos granulócitos é inadequado para manter a intensidade oxidativa necessária para matar as bactérias fagocitadas.

Tratamento

Deve-se suspeitar de deficiência de G6PD em pacientes com ancestrais africanos, da bacia do Mediterrâneo ou asiáticos que apresentem um episódio hemolítico agudo ou icterícia neonatal. A deficiência de G6PD é diagnosticada pela dosagem da atividade de G6PD nos eritrócitos. Esta atividade deve ser dosada quando o paciente não tiver recebido uma transfusão recente nem tiver tido um episódio hemolítico recente. (Como a deficiência de G6PD ocorre primariamente nos eritrócitos mais velhos, as dosagens da atividade de G6PD nos eritrócitos predominantemente novos presentes durante ou logo após um episódio hemolítico em geral dão um resultado falso-negativo.)

O fundamental no tratamento da deficiência de G6PD é a prevenção da hemólise pelo tratamento imediato das infecções e evitando drogas oxidantes (p. ex., sulfonamidas, sulfonas, nitrofuranos) e toxinas (p. ex., naftaleno). Embora a maioria dos pacientes com um episódio hemolítico não necessite de intervenção médica, aqueles com anemia grave e hemólise podem precisar de ressuscitação e transfusões de eritrócitos. Os pacientes que se apresentam com icterícia neonatal respondem bem às mesmas terapias que outras crianças com icterícia neonatal (hidratação, terapia leve e transfusões de troca)

Risco de Herança

Cada filho de uma mulher portadora da mutação *G6PD* tem um risco de 50% de ser afetado e cada filha tem uma chance de 50% de ser portadora. Cada filha de um pai afetado será portadora, mas cada filho não será afetado porque um pai afetado não contribui com um cromossomo X para seus filhos homens O risco de que as filhas portadoras tenham sintomas clínicos significativos é baixo, pois os desvios de inativação do cromossomo X são relativamente raros.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. O consumo de feijões de fava e a ocorrência de deficiência de G6PD são coincidentes em muitas áreas. Que vantagem evolutiva o consumo de fava pode ter dado às populações com deficiência de G6PD?
2. Várias centenas de mutações diferentes foram descritas como causando deficiência de G6PD. Supostamente, todas estas mutações persistiram devido à seleção. Discuta a vantagem dos heterozigotos no contexto da deficiência de G6PD.
3. O que é farmacogenética? Como a deficiência de G6PD ilustra os fundamentos da farmacogenética?

Referências

Luzzatto L, Melta A, Vulliamy T (2001) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *In* Scriver CR, Beadet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp. 4517–4553.

Diabetes Melito Insulino-Dependente

(Destruição Auto-imune de Células Beta das Ilhotas)

Multifatorial

Fundamentos

- Doença poligênica
- Disparador ambiental
- Alelo de suscetibilidade
- Alelo protetor

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância à vida adulta
- Poliúria, polidipsia, polifagia
- Hiperglicemia
- Cetose
- Emaciação

História e Achados Físicos

F.C., um pai de 45 anos de idade com diabetes melito de manifestação tardia, foi encaminhado a uma clínica de endocrinologia para informações quanto ao risco de seu filho ter diabetes F.C. desenvolveu intolerância à glicose (incapacidade de manter níveis normais de glicose sanguínea após a ingestão de açúcar) aos 39 anos e hiperglicemia de jejum aos 45 anos. Ele não tinha uma história de outros problemas médicos ou cirúrgicos. Os achados de seu exame físico foram normais, exceto por uma moderada obesidade abdominal. Ele tinha 5 filhos com duas mulheres. Um filho de cada uma delas desenvolveu diabetes melito dependente de insulina (IDDM) antes dos 10 anos. Sua irmã desenvolveu IDDM quando criança e morreu durante a adolescência de cetoacidose diabética. O geneticista explicou que, em vista de sua história familiar, F.C. podia ter a forma tardia de IDDM e que sua atual diabetes não-insulino-dependente provavelmente era antecedente ao desenvolvimento de IDDM. Após discutir as possíveis causas e fatores prognósticos do desenvolvimento de IDDM, F.C. decidiu, com seus filhos, participar de um protocolo de pesquisa do estudo da prevenção de IDDM. Como parte deste estudo, ele e seus filhos foram testados para anticorpos antiilhotas. Tanto ele quanto uma filha não-afetada tinham altos títulos de anticorpos antiilhotas. A filha também tinha um teste anormal de tolerância à glicose, mas não hiperglicemia de jejum. Como parte do protocolo de estudo, F.C. e sua filha receberam doses baixas de injeções de insulina

Bases

Etiologia da Doença

A IDDM (às vezes chamada de diabetes tipo 1) geralmente é causada pela destruição auto-imune das células β das ilhotas pancreáticas. Esta reação auto-imune é disparada por um mecanismo desconhecido. A destruição das células β das ilhotas causa uma deficiência de insulina e, portanto, uma desregulação do anabolismo e do catabolismo, resultando em mudanças metabólicas similares às observadas na inanição (Fig. C.6). Entre os caucasianos norte-americanos, a IDDM é a segunda doença crônica mais comum da infância, aumentando a prevalência de 1 em 2.500 aos 5 anos de idade para 1 em 300 aos 18 anos de idade.

Patogenia

Genética. A IDDM em geral resulta de uma suscetibilidade genética e um subseqüente dano ambiental (ver Cap. 15). Acredita-se que raramente resulte apenas de uma agressão ambiental ou apenas de uma mutação genética. Embora cerca de 90% da IDDM ocorra em pacientes sem uma história familiar de diabetes, as observações de apoio à predisposição genética incluem diferenças na concordância entre os gêmeos monozigóticos (de 33% a 50%) e os gêmeos dizigóticos (de 1% a 14%), agrupamento familiar e diferenças em prevalência entre populações diferentes. Mais de 13 loci diferentes de suscetibilidade genética foram relatados em seres humanos, embora alguns tenham sido identificados consistente e reprodutivamente. Um dos poucos é o locus de HLA, que pode contribuir com até 30% a 60% da suscetibilidade genética. Aproximadamente 95% dos pacientes caucasianos expressam um alelo DR3 ou DR4, ou ambos, comparados com 50% dos controles. Esta associação aparentemente surge não porque DR3 e DR4 sejam alelos de suscetibilidade, mas por causa do desequilíbrio da ligação entre DR e DQ. O alelo $DQ\beta_1$*0201, que se segrega com DR3, e o $DQ\beta_1$*0302, que se segrega com DR4, parecem ser os alelos de suscetibilidade primária. Em contraste, $DQ\beta_1$*602, que se segrega com DR2, parece ser um alelo protetor. Isto é, ele exclui o efeito de um alelo de suscetibilidade quando ambos estão presentes. Ambos os alelos de suscetibilidade $DQ\beta_1$ têm um aminoácido neutro na posição 57, um sítio dentro da hipotética fenda de ligação do antígeno, enquanto os alelos protetores ou neutros $DQ\beta_1$ têm um ácido aspártico na posição 57. Esta substituição de um aminoácido sem carga pelo ácido aspártico é prevista como alterando a especificidade da ligação do antígeno à molécula de DQ.

Ambiente. As evidências que apóiam um componente ambiental para a indução de IDDM em pessoas geneticamente suscetíveis incluem uma concordância de menos de 50% entre os gêmeos monozigóticos, uma variação sazonal na incidência e um aumento de incidência de diabetes entre crianças com rubéola congênita. Os disparadores ambientais propostos incluem as infecções virais e a exposição precoce à albumina bovina. A exposição a vírus e albumina bovina pode causar destruição auto-imune de células β por mimetismo molecular, isto é, compartilhamento de determinantes antigênicos entre proteínas de células β e o vírus ou a albumina bovina. Cerca de 80% a 90% dos pacientes recém-diagnosticados com IDDM têm anticorpos de células das ilhotas. Estes auto-anticorpos reconhecem determinantes citoplasmáticos e de superfície celular tais como descarboxilase de ácido glutâmico (GAD), carboxi peptidase H, antígenos de gangliosídicos, antígeno 69 de células das ilhotas (ICA69) e uma proteína tirosina fosfatase. GAD e ICA69, respectivamente, compartilham epitopos com o vírus *coxsackie* B4 e a albumina sérica bovina.

Em suma, a IDDM parece ser uma doença auto-imune, embora o papel exato dos auto-anticorpos de células das ilhotas permaneça incerto. As evidências adicionais de um mecanismo auto-imune na IDDM incluem um aumento de prevalência de outras doenças auto-imunes, infiltrados de células mononucleares das ilhotas e destruição recorrente de célula β após o transplante de um gêmeo monozigótico. Mas duas linhas de evidência sugerem que a progressão para IDDM envolve mais que o desenvolvimento de auto-anticorpos. Primeiro, menos de 1% da população geral desenvolve diabetes, embora 10% tenha auto-anticorpos das ilhotas. Segundo, primos em primeiro grau e crianças em idade escolar têm taxas de remissão de 10% a 78% para anticorpos de células das ilhotas.

Fenótipo e História Natural

A perda de reserva de insulina ocorre durante alguns a muitos anos. O primeiro sinal de anomalia é o desenvolvimento dos auto-anticorpos das ilhotas quando a glicose sanguínea, a tolerância à glicose (habilidade para manter os níveis normais de glicose sanguínea após a ingestão de

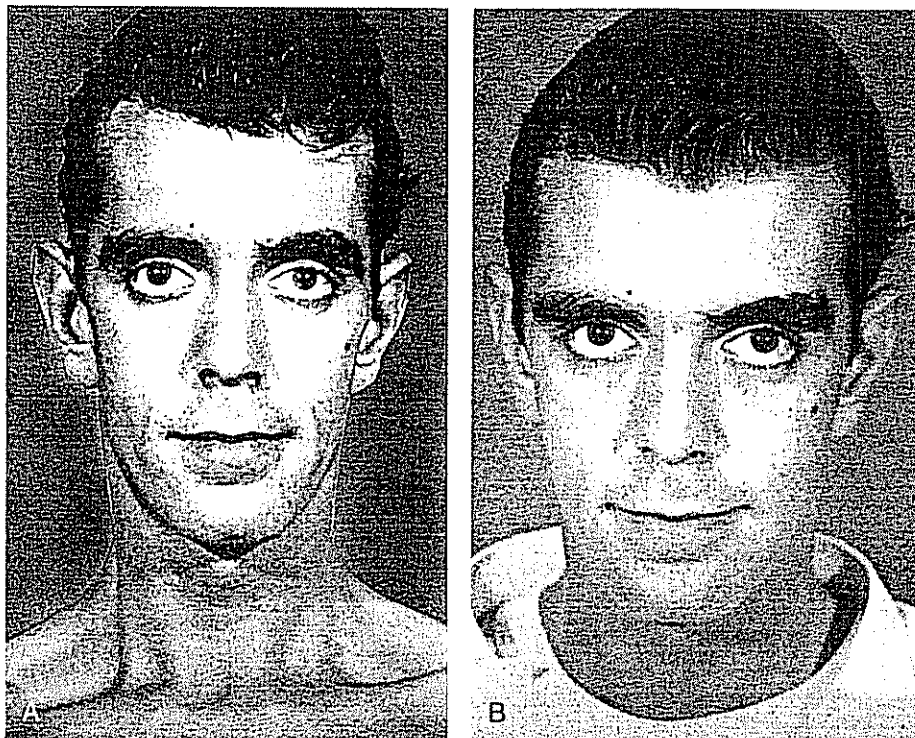



Fig. C.6 Um homem de 28 anos de idade com diabetes melito insulino-dependente *A*. Foto após 3 semanas de polidipsia e poliúria *B*. Foto após ganhar 5 kg em 10 dias de reposição de insulina (Adaptada de Oakley W G , Pyke D A , Taylor K W [1968] Clinical Diabetes and Its Biochemical Basis Blackwell Scientific Publications, Oxford, p 258, por permissão Restauração fotográfica por cortesia de B Moseley-Fernandini)

açúcar) e as respostas insulínicas à glicose são normais Este período é seguido de uma fase de tolerância diminuída à glicose, mas glicose sanguínea normal em jejum Com a perda continuada das células β, a hiperglicemia de jejum eventualmente se desenvolve, mas ainda é produzida insulina suficiente para evitar cetose. Durante este período, os pacientes têm diabetes melito não-insulino-dependente (NIDDM). A produção de insulina acaba caindo abaixo de um limiar crítico, e os pacientes tornam-se dependentes de suplementos exógenos de insulina e têm uma propensão à cetoacidose Os pacientes mais jovens em geral progridem nas três fases mais rapidamente que os pacientes mais idosos.

Embora as complicações agudas da diabetes possam ser controladas pela administração de insulina exógena, a perda de produção de insulina endógena causa muitos problemas, incluindo aterosclerose, neuropatia periférica, doença renal, cataratas e retinopatia Cerca de 50% dos pacientes eventualmente morrem de insuficiência renal. O desenvolvimento e a gravidade destas complicações estão relacionados à constituição genética e ao grau de controle metabólico O controle rigoroso dos níveis de glicose sanguínea reduz o risco de complicações em 35% a 75%.

Tratamento

Embora o transplante pancreático ou de ilhotas possa curar a IDDM, a escassez de tecido para transplante e as complicações da imunossupressão limitam esta terapia. O tratamento da maioria dos pacientes enfatiza o intenso controle dos níveis de glicose sanguínea pela injeção de insulina exógena.

O desenvolvimento dos auto-anticorpos das ilhotas muitos anos antes do início de IDDM levou ao desenvolvimento de estudos para prever e evitar a IDDM A administração de insulina ou nicotinamida parece retardar o desenvolvimento de IDDM em alguns pacientes.

Risco de Herança

O risco de IDDM na população geral é de aproximadamente 1 em 300. Com um irmão afetado, o risco aumenta para 1 em 14 (1 em 6 se com HLA idêntico, 1 em 20 se com haplótipo de HLA idêntico) Com um segundo parente em primeiro grau afetado, além de um irmão afetado, o risco aumenta para 1 em 6 e com um gêmeo monozigótico afetado, para 1 em 3. Os filhos de uma mãe afetada têm um risco de 1 em 50 a 1 em 33 de desenvolver IDDM, enquanto os filhos de um pai afetado têm um risco de 1 em 25 a 1 em 16. Este risco aumentado em relação à paternidade parece ser limitado a pais com um alelo HLA DR4.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Discuta as dificuldades de identificação dos componentes genéticos das doenças poligênicas
2. Como os alelos de HLA de suscetibilidade afetam a suscetibilidade e os alelos protetores afetam a proteção?
3. Discuta o(s) mecanismo(s) para prevenção de IDDM pelas injeções exógenas de insulina.
4. Compare a informação do risco para pais ou mães com IDDM. Discuta os riscos teratogênicos e os mecanismos da diabetes materna.

Referências

Sperling MA (1999) Diabetes Mellitus. *In* Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (eds) Nelson Textbook of Pediatrics, 16th ed WB Saunders, Philadelphia, pp 1767–1786.

Diabetes Melito Não-Insulino-Dependente

(Deficiência e Resistência à Insulina)

Multifatorial

Fundamentos

- Doença poligênica
- Modificadores ambientais

Principais Características Fenotípicas

- Idade de manifestação: da infância até a vida adulta
- Hiperglicemia
- Deficiência relativa de insulina
- Resistência à insulina
- Obesidade
- Acantose *nigricans*

História e Achados Físicos

M.P., um índio Pima saudável de 38 anos de idade, pediu informações sobre seu risco de desenvolver diabetes melito não-insulino-dependente (NIDDM), uma doença que afeta quase 50% do povo Pima por volta dos 35 anos de idade. Ambos os seus genitores tinham tido NIDDM. Seu pai morrera aos 60 anos de infarto do miocárdio e sua mãe aos 55 anos, de insuficiência renal. Seus avós paternos e uma irmã mais velha também tinham NIDDM, mas ele e seus quatro irmãos mais jovens não tinham a doença. Os achados do exame físico de M.P. eram normais exceto por uma leve obesidade. Ele tinha um nível sanguíneo de glicose em jejum normal, mas um nível sanguíneo elevado de insulina e níveis sanguíneos de glicose anormalmente altos após uma sobrecarga oral de glicose. Estes resultados eram compatíveis com um antecedente para NIDDM. O médico avisou a M.P. para mudar seu estilo de vida, de modo que perdesse peso e aumentasse sua atividade física. M.P. reduziu acentuadamente seu consumo dietético de gordura, começou a ir para o trabalho de bicicleta e a fazer caminhadas três vezes por semana. Seu peso diminuiu 10 kg e sua tolerância à glicose e nível de insulina sanguínea ficaram normais.

Bases

Etiologia da Doença

A NIDDM contribui com 80% a 90% de todas as diabetes melito e tem uma prevalência de 6% a 7% nos EUA. É uma doença heterogênea composta de tipo 1 (auto-imune) e tipo 2 (não-auto-imune). Cerca de 5% a 10% dos pacientes com NIDDM têm diabetes tipo 1 (ver o caso que descreve o paciente F.C., diabetes melito insulino-dependente [IDDM]), de 5% a 10% têm diabetes com início na maturidade, de 5% a 10% têm um distúrbio genético raro e os 70% a 85% restantes têm "NIDDM típica", uma forma de diabetes melito tipo 2 caracterizada por uma relativa deficiência e resistência à insulina. As bases genéticas e moleculares da "NIDDM típica" ainda são pouco definidas.

Patogenia

A "NIDDM típica", daqui por diante chamada de NIDDM, resulta de uma combinação de suscetibilidade genética e fatores ambientais. As observações que apóiam uma predisposição genética incluem diferenças em concordância entre os gêmeos monozigóticos e dizigóticos, agrupamento familiar e diferenças na prevalência entre as populações. Os padrões de herança humana e os modelos em rato de NIDDM sugerem uma herança poligênica, mas a identificação dos genes relevantes nos seres humanos é confundida pelos efeitos da idade, do sexo, da etnia, do condicionamento físico, da dieta, do fumo, da obesidade e da distribuição de gordura sobre a sensibilidade à insulina e sua secreção. As triagens genômicas e as análises de mais de 250 genes candidatos não identificaram loci genéticos importantes comuns, embora as triagens nos grupos finlandeses e méxico-americanos tenham identificado loci de predisposição aparentemente específicos para estas populações. As evidências de um componente ambiental incluem uma concordância de menos de 100% nos gêmeos monozigóticos, diferenças na prevalência em populações geneticamente similares e associações ao estilo de vida, à dieta, à obesidade, à gravidez e ao estresse. O conjunto de evidências experimentais sugere que, embora a suscetibilidade genética seja um pré-requisito para a NIDDM, a expressão clínica da NIDDM possivelmente é bastante determinada pelos fatores ambientais.

A NIDDM resulta de perturbações na secreção e na resistência à ação da insulina. Normalmente, a secreção basal de insulina segue um padrão rítmico, interrompido por respostas às sobrecargas de glicose. Nos pacientes com NIDDM, a liberação rítmica basal de insulina é bastante perturbada, as respostas às sobrecargas de glicose são inadequadas e os níveis de insulina basal são elevados, embora baixos em relação à hiperglicemia destes pacientes.

A hiperglicemia persistente e a hiperinsulinemia desenvolvem-se antes da NIDDM e iniciam um ciclo que leva à NIDDM. A hiperglicemia persistente dessensibiliza as células β das ilhotas de tal modo que menos insulina é liberada para um determinado nível de glicose sanguínea. Similarmente, os níveis basais elevados crônicos de insulina regulam para menos (*downregulate*) os receptores de insulina e, assim, aumentam a resistência à insulina. Além disso, como a sensibilidade à insulina declina, o glucagon não é contido e é hipersecretado. Conseqüentemente, aumenta a liberação de glucagon pelo fígado, piorando a hiperglicemia. Finalmente, este ciclo leva à NIDDM e à sua progressão.

Fenótipo e História Natural

A NIDDM em geral afeta as pessoas obesas de meia-idade ou além disso, embora uma quantidade crescente de crianças e pessoas jovens estejam sendo cada vez mais afetadas e tornando-se obesas e sedentárias.

A NIDDM tem um início insidioso, e o diagnóstico em geral é feito pelo nível elevado de glicose no exame de rotina. Em contraste com os pacientes com IDDM, os pacientes com NIDDM em geral não desenvolvem cetoacidose. Em geral, o desenvolvimento da NIDDM é dividido em três fases clínicas. Primeira, a glicose do plasma permanece normal, a despeito da resistência à insulina. Segunda, a hiperglicemia pós-prandial se desenvolve, a despeito das concentrações elevadas de insulina. Terceira, a secreção declinante de insulina causa hiperglicemia de jejum e a diabetes se manifesta.

Em adição à hiperglicemia, a desregulação metabólica resultante da disfunção de células β das ilhotas e a resistência à insulina causam aterosclerose, neuropatia periférica, doença renal, cataratas e retinopatia (Fig. C.7). O desenvolvimento destas complicações está relacionado à composição genética e ao grau de controle metabólico. Um rigoroso controle dos níveis de glicose sanguínea reduz o risco de complicações em 35% a 75%.

Tratamento

A perda de peso, o aumento da atividade física e as mudanças dietéticas ajudam muitos pacientes com NIDDM, melhorando acentuadamente a sensibilidade à insulina e o controle. Infelizmente, muitos pacientes são incapazes ou não desejam mudar seu estilo de vida o suficiente para

Comparação entre o Tipo 1 e o Tipo 2 da Diabetes Melito

Característica	Tipo 1	Tipo 2
Sexo	Feminino = Masculino	Feminino > Masculino
Idade de início	Infância e adolescência	Adolescência até a vida adulta
Predominância étnica	Caucasianos	Afro-americanos, méxico-americanos, americanos nativos
Concordância		
Gêmeos monozigóticos	33% - 50%	69% - 90%
Gêmeos dizigóticos	1% - 14%	24% - 40%
História familiar	Incomum	Comum
Auto-imunidade	Comum	Incomum
Corpo	Normal a magro	Obeso
Acantose nigricante	Incomum	Comum
Insulina plasmática	Baixa ou ausente	Normal a alta
Glucagon plasmático	Alto, suprimível	Alto, resistente
Complicação aguda	Cetoacidose	Coma hiperosmolar
Terapia de insulina	Responsivo	Responsivo a resistente
Terapia de sulfoniluréia	Não-responsivo	Responsivo

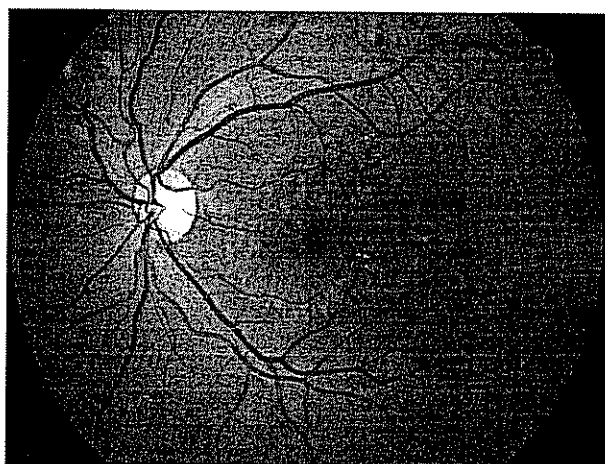



Fig. C.7 Foto de uma retinopatia diabética não-proliferativa em um paciente com diabetes melito não-insulino-dependente. Notar as múltiplas hemorragias "*dot-and-blot*", as manchas espalhadas de exsudato intra-retinal e, supranasalmente, algumas manchas "em algodão" (Cortesia de R. A. Lewis, Baylor College of Medicine, Houston.)

conseguir o controle e precisam de tratamento com agentes hipoglicemiantes orais, tais como sulfoniluréias e biguanidas. Os hipoglicemiantes orais não são tão efetivos quanto a perda de peso, o aumento da atividade física e as mudanças dietéticas para atingir o controle glicêmico. Para atingi-lo e, possivelmente, reduzir o risco de complicações diabéticas, alguns pacientes precisam de tratamento com insulina exógena. Entretanto, a terapia com insulina acentua a resistência à insulina, aumentando a hiperinsulinemia e a obesidade.

Risco de Herança

O risco da NIDDM na população geral é altamente dependente da população considerada. Na maioria das populações, este risco é de 1% a 5%, embora seja de 6% a 7% nos EUA. Se um paciente tiver um irmão afetado, o risco aumentará para 1 em 10. Se um irmão e outro parente em primeiro grau forem afetados, o risco será de 1 em 5, e se um dos gêmeos monozigóticos for afetado, o risco será de 1 em 2 a 1 em 1. Além disso, como algumas formas de NIDDM são antecedentes à IDDM (ver o caso descrito de F.C.), os filhos de genitores com NIDDM têm um risco empírico de 1 em 10 de desenvolver IDDM.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Como poderiam os órgãos de planejamento atuar com grande impacto no tratamento de pacientes com NIDDM?
2. Que informações devem receber os membros, inclusive os filhos, das famílias com NIDDM?
3. Que fatores estão contribuindo para o aumento da prevalência de NIDDM?

Referências

Foster DW (1998) Diabetes mellitus. *In* Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al (eds) Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th ed. McGraw-Hill, Philadelphia, pp. 2060–2081.

Distrofia Muscular Duchenne

(Mutação DMD)

Ligada ao X

Fundamentos

- Alta freqüência de mutações novas
- Heterogeneidade alélica
- Portadores manifestantes
- Variabilidade fenotípica

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância
- Fraqueza muscular
- Hipertrofia da panturrilha
- Comprometimento intelectual moderado
- Nível elevado de creatina cinase sérica

História e Achados Físicos

A.Y. era um menino de 6 anos de idade encaminhado por um pequeno retardo de desenvolvimento. Ele tinha dificuldade para subir escadas, correr e participar de atividades físicas vigorosas. Ele tinha tanto a força quanto a resistência diminuídas. Seus genitores, dois irmãos e uma irmã eram todos saudáveis. Nenhum outro membro da família era similarmente afetado. Ao exame, ele tinha dificuldade para subir na mesa de exame, um sinal de Gowers (uma seqüência de manobras para se levantar do chão, Fig. C.8), fraqueza proximal, um andar oscilante, tendões calcâneos rígidos e aumento da panturrilha. Seu nível de creatina cinase (CK) estava 50 vezes maior que o normal. Em função da história, dos achados do exame físico e do nível fortemente elevado de CK sugerirem uma miopatia, A.Y. foi encaminhado a uma clínica de neurogenética para uma melhor avaliação. Os resultados de sua biópsia muscular mostraram uma acentuada variação no tamanho das fibras musculares, necrose de fibras, proliferação de tecido gorduroso e conjuntivo e ausência de coloração para distrofina. Com base nestes resultados, a condição de A.Y. recebeu um diagnóstico de distrofia muscular Duchenne (DMD) e ele foi testado quanto a deleções do gene de distrofina. Observou-se que ele tinha uma deleção dos exons 45 a 48. Os testes subseqüentes mostraram que sua mãe era portadora. A família foi informada de que o risco de filhos afetados era de 50%, o risco de filhas afetadas era baixo, mas dependia de desvios da inativação do X, e o risco de filhas portadoras era de 50%. Como sua condição de portadora a colocava em alto risco de complicações cardíacas, a mãe foi encaminhada para uma avaliação cardíaca.

Bases

Etiologia da Doença

A DMD é uma miopatia progressiva pan-étnica ligada ao X causada por mutações no gene *DMD*. Ela tem uma incidência de aproximadamente 1 em 3.500 nascimentos masculinos.

Patogenia

DMD codifica a distrofina, uma proteína intracelular que se expressa predominantemente nos músculos lisos, esqueléticos e cardíacos, bem como em alguns neurônios cerebrais (ver Cap. 12). Nos músculos esqueléticos, a distrofina é parte de um grande complexo de proteínas associadas ao sarcolema que confere estabilidade ao sarcolema.

As mutações de *DMD* associadas à DMD incluem grandes deleções (de 50% a 70%): grandes duplicações (de 5% a 10%); e pequenas deleções, inserções ou mudanças de nucleotídeos (de 25% a 30%). A maioria das grandes deleções ocorre em um dentre dois pontos quentes. As mudanças de nucleotídeos ocorrem ao longo do gene, predominantemente nos dinucleotídeos CpG. As mutações *de novo* surgem com fre-

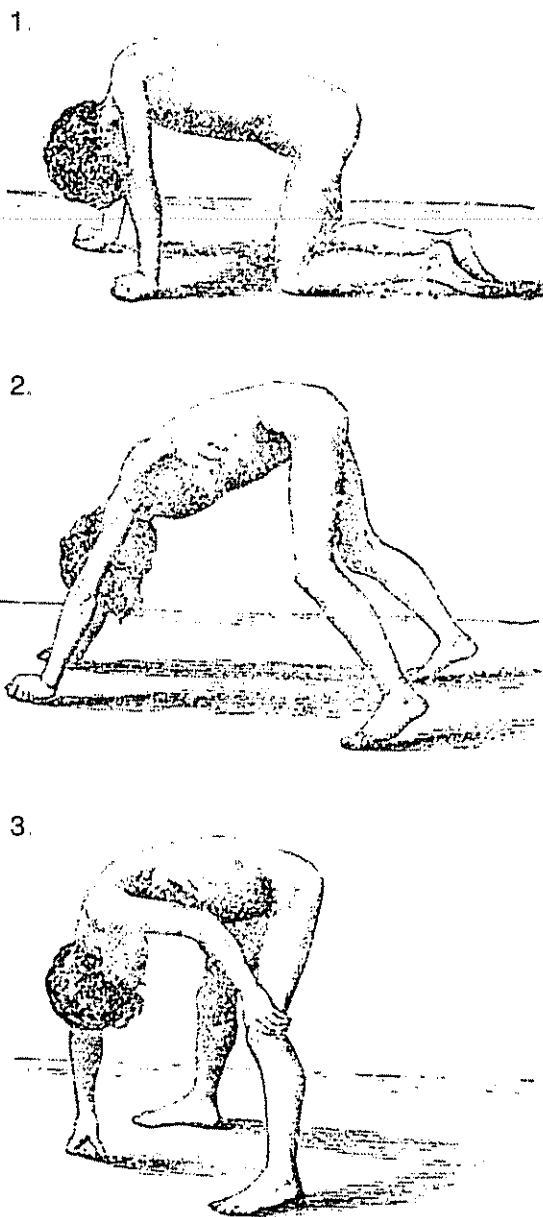



Fig. C.8 Desenho de um menino com distrofia muscular Duchenne se levantando do chão (manobra de Gowers). (Gowers W. R. [1879] Pseudohypertrophic Muscular Paralysis. A Clinical Lecture. J. and A. Churchill. London.)

qüência comparável durante a ovocitogênese e a espermatogênese. A maioria das grandes deleções *de novo* surge durante a ovocitogênese, enquanto a maioria das mudanças *de novo* de nucleotídeos surge durante a espermatogênese.

As mutações que causam um fenótipo nulo de distrofina causam uma doença muscular mais grave que os alelos mutantes de *DMD* que expressam uma distrofina parcialmente funcional. Uma correlação genótipo-fenótipo consistente não foi definida para o prejuízo intelectual.

Fenótipo e História Natural

Homens. A DMD é uma miopatia progressiva que resulta em degeneração muscular e fraqueza. Começando com os músculos da cintura dos quadris e flexores do pescoço, a fraqueza muscular progressivamente envolve a cintura dos ombros e os músculos dos membros distais e tronco. Embora ocasionalmente se manifeste no período neonatal com hipotonia ou falta de desenvolvimento, os pacientes masculinos em geral apresentam anomalias da marcha entre as idades de 3 e 5 anos. Aos 5 anos, a maioria dos pacientes usa a manobra de Gowers e tem pseudo-hipertrofia da panturrilha, isto é, um aumento da panturrilha pela substituição dos músculos por gordura e tecido conjuntivo. Aos 12 anos a maioria dos pacientes está confinada à cadeira de rodas e tem ou está desenvolvendo contraturas e escoliose. A maioria dos pacientes morre por prejuízo da função pulmonar e pneumonia. A média de idade da morte é 18 anos.

Quase 95% dos pacientes com DMD têm algum comprometimento cardíaco (cardiomiopatia dilatada ou anomalias eletrocardiográficas, ou ambas) e 84% têm envolvimento cardíaco demonstrável na autópsia. A insuficiência cardíaca crônica desenvolve-se em cerca de 50% dos pacientes. Raramente a insuficiência cardíaca é a queixa que se apresenta nos pacientes com DMD.

Embora a distrofina também esteja presente na musculatura lisa, são raras as complicações de músculos lisos. Estas complicações incluem dilatação gástrica e paralisia do íleo e da bexiga.

Os pacientes com DMD têm uma inteligência média com desvio padrão de aproximadamente 1 abaixo da média e quase um terço deles têm algum grau de retardo mental. A base deste prejuízo ainda não foi estabelecida.

Mulheres. A idade de início e a gravidade da DMD nas mulheres dependem do grau de desvio da inativação do X (ver Cap. 5). Se o cromossomo X portador do alelo DMD mutante for ativo na maioria das células, as mulheres desenvolverão DMD, enquanto se o cromossomo X portador do alelo *DMD* normal for predominantemente ativo as mulheres terão poucos ou nenhum sintoma de DMD. Independentemente de desenvolverem sintomas clínicos de fraqueza dos músculos esqueléticos, a maioria das mulheres portadoras desenvolve anomalias cardíacas, tais como cardiomiopatia, dilatação do ventrículo esquerdo ou mudanças eletrocardiográficas.

Tratamento

O diagnóstico de DMD é baseado na história familiar e na análise de DNA ou biópsia muscular para testar a imunorreatividade de distrofina.

Atualmente não há tratamentos curativos para a DMD, embora os tratamentos de melhora sintomática tenham aumentado a longevidade média do final da infância para o começo da vida adulta. Os objetivos da terapia são diminuir a progressão da doença, manter a mobilidade, evitar e corrigir as contraturas e a escoliose, controlar o peso e otimizar as funções pulmonar e cardíaca. A terapia com glicocorticóides pode diminuir a progressão da DMD por muitos anos. A maioria dos pacientes também requer uma ampla informação sobre como lidar com os efeitos psicológicos de ter uma doença fatal crônica.

Risco de Herança

Cerca de um terço das mães que têm um só filho afetado não são portadoras de uma mutação no gene *DMD*. A determinação da condição de portadora permanece bem difícil, entretanto, pois os métodos moleculares atualmente disponíveis não detectam pequenas alterações, tais como as mudanças de nucleotídeos. A determinação do risco de ser portadora em famílias sem deleções ou duplicações identificáveis deve basear-se na análise de ligação, nos níveis séricos seriados de CK e na expressão de mosaicismo de distrofina nas amostras de biópsias musculares (devida à inativação aleatória do cromossomo X). A informação do risco de recorrência leva em conta a alta taxa de mosaicismo germinativo (aproximadamente 14%).

Se a mãe é portadora, cada filho tem um risco de 50% de ter DMD e cada filha tem um risco de 50% de ter herdado a mutação de *DMD*. Refletindo a natureza aleatória da inativação do cromossomo X, as filhas que herdam a mutação *DMD* têm um risco baixo de ter DMD. Entretanto, por motivos ainda não totalmente compreendidos, seu risco de ter anomalias cardíacas pode ser tão alto quanto 50% a 60%. Se, pelos testes de DNA, uma mãe aparentemente não é portadora, ela ainda tem um risco de cerca de 7% de ter um filho com DMD. Este risco elevado deve-se a um mosaicismo de linhagem germinativa (ver Cap. 5). A informação e, possivelmente, um diagnóstico pré-natal são indicados para estas mães.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Por que a DMD é considerada uma condição letal genética? Que características definem uma condição como sendo geneticamente letal?
2. Discuta que mecanismos podem causar uma desproporção de sexos na origem dos tipos de mutação. Cite duas ou três doenças, além da DMD, nas quais isto ocorre. Em particular, discuta o mecanismo e a alta freqüência de mutações nos dinucleotídeos CpG durante a espermatogênese.
3. Como se determina a taxa de mosaicismo de mutações germinativas para uma doença? Cite duas ou três outras doenças com uma alta taxa de mosaicismo germinativo.
4. Contraste o fenótipo da distrofia muscular Becker com a DMD. Qual o mecanismo postulado para o fenótipo brando da distrofia muscular Becker?

Referências

Gene Clinics
http://www.geneclinics.org/

Worton RG, Molnar MJ, Brais B, Karpati G (2001) The muscular dystrophies. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp. 5493–5524.

Doença de Alzheimer

(Disfunção Neuronal Cerebral e Morte)

Autossômica Dominante ou Multifatorial

Fundamentos

- Expressividade variável
- Heterogeneidade genética
- Dosagem gênica
- Ganho tóxico de função
- Modificador de risco

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da vida adulta média à tardia
- Demência
- Placas β-amilóides
- Emaranhados neurofibrilares
- Angiopatia amilóide

História e Achados Físicos

L.W. era uma mulher idosa com demência. Oito anos antes de sua morte, ela e sua família notaram um déficit de sua memória a curto prazo. Inicialmente, atribuíram isto ao esquecimento dos idosos. Seu declínio cognitivio continuou, entretanto, e progressivamente interferiu em sua habilidade de dirigir, fazer compras e manter a casa. L.W. não tinha achados sugestivos de doença de tireóide, deficiência de vitamina, tumor cerebral, intoxicação por drogas, infecção crônica, depressão ou derrames. As imagens de ressonância magnética de seu cérebro mostraram uma atrofia cortical difusa. O irmão de L.W., seu pai e dois outros parentes paternos tinham morrido com demência aos setenta e poucos anos. Um neurologista explicou a L.W. e sua família que o envelhecimento normal não está associado a um acentuado declínio de memória ou julgamento e que a cognição em declínio, com distúrbio do comportamento e prejuízo do funcionamento diário, sugeria um diagnóstico clínico de demência familiar, possivelmente doença de Alzheimer (AD). A suspeita de AD foi apoiada por seu genótipo de apolipoproteína E: $\epsilon 4/4$. A condição de L.W. deteriorou-se rapidamente durante o ano seguinte e ela morreu de desnutrição aos 75 anos de idade. Sua autópsia confirmou o diagnóstico de AD.

Bases

Etiologia da Doença

Aproximadamente 10% das pessoas com mais de 70 anos têm demência e cerca de metade delas tem AD. A AD é uma doença pan-étnica geneticamente heterogênea. Menos de 5% dos pacientes têm a doença familiar de início precoce, de 15% a 25% têm a doença familiar em idade avançada e 75% têm a forma esporádica. Aproximadamente 10% da AD familiar apresentam herança autossômica dominante; os demais casos apresentam herança multifatorial. Menos de 1% dos pacientes com AD têm síndrome de Down (ver Caps. 12 e 15).

As atuais evidências sugerem que defeitos no metabolismo da proteína precursora β-amilóide causam a disfunção neuronal e a morte observadas na AD. Compatível com esta hipótese, as mutações associadas à AD autossômica dominante de início precoce foram identificadas no gene da proteína precursora β-amilóide (*APP*), no gene pré-senilina 1 (*PSEN1*) e no gene pré-senilina 2 (*PSEN2*) (ver Cap. 12). A prevalência de mutações nestes genes varia amplamente dependendo do critério de inclusão do estudo. De 20% a 70% dos pacientes com AD autossômica dominante de início precoce têm mutações em *PSEN1*, de 10% a 15% têm mutações em *APP* e menos de 5% têm mutações em *PSEN2*.

Nenhuma causa de AD de manifestação tardia foi identificada. Entretanto, tanto a AD de início tardio esporádico quanto a familiar estão fortemente associadas ao alelo $\epsilon 4$ do gene de apolipoproteína E (*APOE*). A freqüência de $\epsilon 4$ é de 12% a 15% nos controles normais, comparada com 35% em todos os pacientes com AD e 45% nos pacientes com uma história familiar de demência.

Patogenia

A proteína precursora β-amilóide (APP) sofre clivagem endoproteolítica para produzir peptídeos com atividades neurotróficas e neuroprotetoras. A clivagem de APP dentro do compartimento endossomos-lisossomos produz um peptídeo carboxila-terminal de 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$). A função de $A\beta_{40}$ é desconhecida. Em contraste, a clivagem de APP dentro do retículo endoplasmático ou cis-Golgi produz um peptídeo carboxila-terminal de 42 ou 43 aminoácidos ($A\beta_{42/43}$). $A\beta_{42/43}$ prontamente se agrega e é neurotóxico *in vitro* e, possivelmente, *in vivo*. Os pacientes com AD têm um aumento significativo de agregados $A\beta_{42/43}$ dentro do cérebro. As mutações em *APP*, *PSEN1* e *PSEN2* aumentam a produção relativa ou absoluta de $A\beta_{42/43}$. Os pacientes com síndrome de Down hiperexpressam APP (cujo gene está no cromossomo 21) e, portanto, $A\beta_{42/43}$. O papel de *APOE* $\epsilon 4$ é incerto.

A AD é um distúrbio neurodegenerativo central, especialmente dos neurônios colinérgicos do hipocampo, da área de associação neocortical e de outras estruturas límbicas. A neuropatologia inclui atrofia cortical, placas neuríticas extracelulares, emaranhados neurofibrilares neuronais (Fig. C.9) e depósitos amilóides nas paredes das artérias cerebrais. As placas neuríticas (ver Fig. C.9) contêm muitas proteínas diferentes, inclusive $A\beta_{42/43}$ e ApoE. Os emaranhados neurofibrilares são predominantemente compostos de proteína tau hiperfosforilada; tau ajuda a manter a integridade neuronal, o transporte axonal e a polaridade axonal promovendo a montagem e a estabilidade dos microtúbulos.

Fenótipo e História Natural

A AD é caracterizada por uma perda progressiva da função cognitiva, incluindo a memória recente, o raciocínio abstrato, a concentração, a linguagem, a percepção visual e a função visual-espacial. Começando com uma súbita perda de memória, a AD em geral é inicialmente atribuída a um "esquecimento" benigno. Alguns pacientes percebem seu declínio cognitivo e ficam frustrados e ansiosos, enquanto outros não percebem. Eventualmente, os pacientes são incapazes de andar e precisam de supervisão. A etiqueta social e a conversação superficial em geral são mantidas surpreendentemente bem. No final, a maioria dos pacientes desenvolve rigidez, mutismo e incontinência, ficando restritos ao leito. Outros sintomas associados à AD incluem agitação, retraimento social, alucinações, convulsões, mioclonia e características parkinsonianas. A morte em geral resulta de desnutrição, infecção ou doença cardíaca.

À parte a idade de início, não se pode distinguir clinicamente a AD de início precoce da AD de início tardio. As mutações em *PSEN1* são totalmente penetrantes e em geral causam uma doença de progressão rápida, com uma média de início aos 45 anos. As mutações em *APP* são totalmente penetrantes e causam uma taxa de progressão de AD similar à da AD de início tardio. A idade de início varia dos 40 ao início dos 60 anos. As mutações em *PSEN2* podem não ser totalmente penetrantes e em geral causam uma doença lentamente progressiva, com o início variando dos 40 aos 75 anos. Em contraste com a AD de início precoce, a AD de início tardio desenvolve-se após os 60 a 65 anos de idade. A

Fig. C.10 Perda muscular distal em um homem afetado pela duplicação *PMP22* (Cortesia de J R Lupski, Baylor College of Medicine, Houston, e C Garcia, Tulane University, New Orleans)

sos como resultado da desmielinização. A redução total da NCV em geral está presente dos 2 aos 5 anos de idade, embora os sintomas clinicamente aparentes possam não se manifestar por muitos anos.

Tratamento

Embora se suspeite do diagnóstico de CMT1 em função de características clínicas, eletrofisiológicas e patológicas, um diagnóstico definitivo em geral depende da detecção de uma mutação. As neuropatias periféricas inflamatórias com freqüência são difíceis de distinguir da CMT1 e da HNPP, e antes do advento dos testes moleculares muitos pacientes com neuropatias herdadas foram tratados com imunossupressores e tiveram uma morbidade associada sem a melhora de sua neuropatia.

O tratamento enfoca a conduta sintomática, pois terapias curativas atualmente não estão disponíveis para CMT1 Paralelamente à progressão da doença, a terapia em geral segue três estágios: exercícios de fortalecimento e alongamento para manter a marcha e o funcionamento, uso de órteses e aparelhos adaptativos especiais e cirurgia ortopédica. Uma posterior deterioração pode requerer o uso de suportes ambulatórios, tais como bengalas ou andadores, e em raros pacientes muito afetados, o uso de cadeira de rodas. Todos os pacientes devem ser aconselhados a evitar a exposição a medicações e substâncias neurotóxicas

Risco de Herança

Como a duplicação de *PMP22* e a maioria das mutações de ponto em *PMP22* são autossômicas dominantes e totalmente penetrantes, cada filho de um genitor afetado tem um risco de 50% de desenvolver CMT1A. A expressividade variável da duplicação *PMP22* e das mutações *PMP22*, entretanto, torna a previsão da gravidade da doença impossível.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. As deleções genômicas e duplicações freqüentemente surgem pela recombinação entre as seqüências repetitivas dentro do genoma humano (ver Cap. 10). Cite três distúrbios causados por deleção após uma suposta recombinação entre seqüências repetidas. Quais destas deleções estão associadas à duplicação recíproca? O que a identificação de uma duplicação recíproca sugere sobre o mecanismo da recombinação? O que a ausência de uma duplicação recíproca sugere?
2. Pelo menos dois mecanismos diferentes causam deleções cromossômicas humanas Contraste o mecanismo molecular que leva à deleção de HNPP com o que leva à deleção da síndrome de Jacobsen
3. Em geral, as duplicações genômicas estão associadas a uma doença menos grave que as deleções genômicas. Entretanto, a duplicação de um alelo *PMP22* em geral causa doença mais grave que a deleção de um alelo *PMP22*. Discuta os possíveis motivos disso
4. Cite duas outras doenças que são causadas por um efeito de dosagem gênica.

Referências

GeneClinics
http://www genectinics.org/

Doença de Huntington

(Mutação HD)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Expansão de repetição de trincas
- Mutação de ganho de função
- Antecipação específica de sexo
- Expressividade variável
- Penetrância reduzida
- Informação pré-sintomática

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da infância adiantada até a vida adulta avançada
- Anomalias de movimento
- Anomalias cognitivas
- Anomalias psiquiátricas

História e Achados Físicos

M P , um homem de 45 anos de idade, apresentou-se inicialmente com um declínio de memória e concentração. À medida que sua função intelectual se deteriorou durante o ano seguinte, ele desenvolveu movimentos involuntários nos dedos e artelhos, bem como distorções faciais. Ele estava ciente de sua condição e ficou deprimido. Ele havia sido saudável antes e não tinha uma história de nenhum parente afetado de modo semelhante. Seus genitores haviam morrido na década dos 40 anos em um acidente de automóvel. M P tinha uma filha saudável. Após uma extensa avaliação, o neurologista diagnosticou a condição de M.P. como doença de Huntington (HD). O diagnóstico de HD foi confirmado por uma análise de DNA que mostrou 43 repetições CAG em um de seus alelos *HD* (normal, < 26). Os testes pré-sintomáticos na filha de M P. mostraram que ela também tinha herdado o alelo mutante de *HD* (Fig. C.11). Ambos receberam ampla informação

Bases

Etiologia da Doença

A HD é um distúrbio neurodegenerativo progressivo autossômico dominante pan-étnico, que é causado por mutações no gene *HD* (ver Cap. 12). A prevalência da HD varia de 3 a 7 por 100.000 entre os europeus ocidentais até 0,1 a 0,38 por 100.000 entre os japoneses. Esta variação na prevalência reflete a variação na distribuição de alelos *HD* e haplótipos que estão predispostos à mutação.

Patogenia

O produto do gene *HD*, a huntingtina, é ubiquamente expresso. A função da huntingtina permanece desconhecida.

As mutações causadoras de doença em *HD* em geral resultam de uma expansão de uma seqüência repetida CAG codificante de poliglutamina no exon 1. Os alelos normais de *HD* têm de 10 a 26 repetições CAG, enquanto os alelos mutantes têm mais de 36 repetições (ver Cap. 12). Aproximadamente 3% dos pacientes desenvolvem HD como resultado de uma nova expansão da repetição CAG, enquanto 97% herdam um alelo mutante de *HD* de um genitor não-afetado. Novos mutantes de *HD* surgem da expansão de uma pré-mutação (de 27 a 35 repetições CAG) para uma mutação total. Até agora, todos os pacientes relatados herdaram a nova mutação total de seu pai.

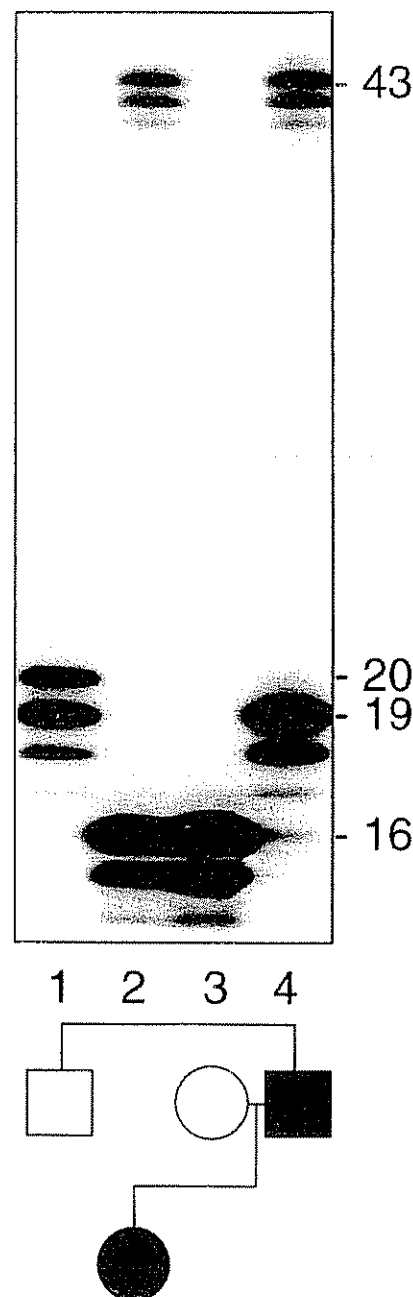



Fig. C.11 Segregação de uma mutação gênica *HD* em uma família com HD. Foto de uma transferência de Southern dos produtos de uma reação em cadeia da polimerase obtidos por amplificação das repetições CAG no éxon 1 do gene *HD*. Observe que o pai afetado e a filha têm ambos um alelo com uma mutação total (43 repetições CAG) e um alelo normal (19 e 16 repetições, respectivamente). A mãe da filha não-afetada e seu tio paterno não-afetado têm alelos *HD* com um número normal de repetições CAG. (Cortesia de M. R. Hayden, University of British Columbia, Vancouver, Canada.)

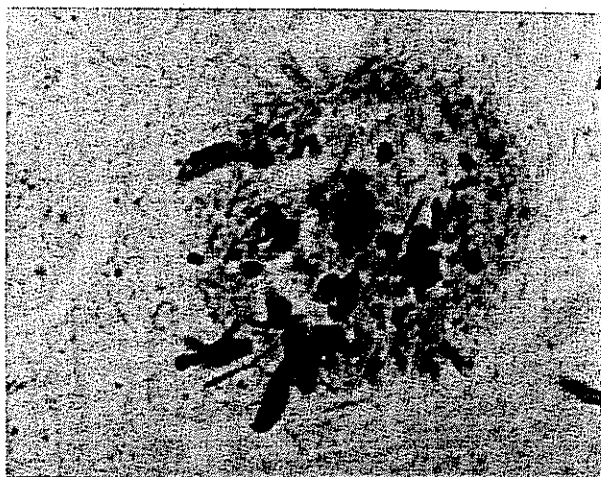



Fig. C.9 Foto de um emaranhado neurofibrilar (*esquerda*) e uma placa neurítica (*direita*) observada na histopatologia cerebral de uma pessoa com doença de Alzheimer (Cortesia de D Armstrong, Baylor College of Medicine and Texas Children's Hospital, Houston)

duração da doença em geral é de 8 a 10 anos, embora a faixa seja de 2 a 25 anos. Tanto para a AD de início tardio quanto para a AD secundária a mutações em *APP*, o alelo *APOE* ϵ4 é um modificador de início dependente de dose. Isto é, a idade de início varia inversamente ao número de cópias do alelo ϵ4.

Tratamento

Exceto para pacientes em famílias que segregam uma mutação associada à AD, os pacientes com demência só podem ser definitivamente diagnosticados com AD pela autópsia. Entretanto, com a rígida observância dos critérios diagnósticos, uma suspeita clínica de AD é confirmada pela neuropatologia em 80% a 90% das vezes. A precisão da suspeita clínica aumenta para 97% se o paciente for homozigoto para o alelo ϵ4 de *APOE*.

Como nenhuma terapia curativa está disponível para a AD, o tratamento é enfocado na melhoria do comportamento associativo e dos problemas neurológicos. Aproximadamente de 10% a 20% dos pacientes têm uma pequena diminuição na taxa de declínio cognitivo se forem tratados cedo no curso da doença com agentes que aumentem a atividade colinérgica.

Risco de Herança

Idade avançada, história familiar, sexo feminino e síndrome de Down são os fatores de risco mais importantes para a AD. Nas populações ocidentais, o risco empírico durante a vida para AD é de 5%. Se os pacientes tiverem um parente em primeiro grau no qual se desenvolveu AD após os 65 anos, eles terão um risco relativo de três a seis vezes de AD. Se os pacientes tiverem um irmão no qual a AD desenvolveu-se antes dos 70 anos e um genitor afetado, seu risco relativo é de sete a nove vezes. O teste de *APOE* é um teste diagnóstico auxiliar e não deve ser usado para testes preditivos de AD em pacientes assintomáticos.

Os pacientes com síndrome de Down têm um risco aumentado de AD. Após os 40 anos, os pacientes com síndrome de Down consistentemente têm achados neuropatológicos de AD, e aproximadamente 50% deles sofrem declínio cognitivo.

Para famílias que segregam a AD autossômica dominante, cada pessoa tem um risco de 50% de herdar uma mutação causadora de AD. Com exceção de algumas mutações em *PSEN2*, a penetrância completa e a idade de início relativamente consistentes dentro de uma família permitem a informação genética. Atualmente, os testes clínicos de DNA estão disponíveis para *APP*, *PSEN1* e *PSEN2*. Os testes de DNA devem ser feitos apenas no contexto da informação genética.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Por que o genótipo de *APOE* não é útil para prever a AD em indivíduos assintomáticos?
2. Por que a AD em geral é um diagnóstico neuropatológico? Qual o diagnóstico diferencial para AD?
3. A mutação de *MAPT*, o gene que codifica a proteína tau, causa a demência frontotemporal. Entretanto, as mutações em *MAPT* não foram detectadas na AD. Compare e contraste os mecanismos propostos pelos quais as anomalias de tau causam demência na AD e demência frontotemporal.
4. Cerca de 30% a 50% do risco populacional para AD é atribuído a fatores genéticos. Que fatores ambientais são propostos para o risco restante? Quais as dificuldades da identificação conclusiva dos fatores de risco ambientais?

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Doença de Charcot-Marie-Tooth Tipo 1A

(Mutação PMP22 ou Duplicação)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Heterogeneidade genética
- Dosagem gênica
- Recombinação entre seqüências repetidas de DNA

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da infância até a vida adulta
- Fraqueza distal progressiva
- Perda muscular distal
- Hiporreflexia

História e Achados Físicos

Durante os últimos anos, J T., uma mulher de 18 anos de idade, notou um declínio progressivo em sua força, resistência e habilidade para correr e andar. Ela também se queixou de freqüentes câimbras nas pernas, exacerbadas pelo frio, e de uma recente dificuldade para passar por cima de objetos e subir escadas Ela não se recorda de nenhuma doença precedente ou de uma história sugestiva de um processo inflamatório Nenhum outro membro da família tem problemas similares ou um distúrbio neuromuscular Ao exame, J.T era magra e tinha atrofia da parte inferior das pernas, leve fraqueza de extensão e flexão do tornozelo, ausência de reflexos do tornozelo, reflexos patelares reduzidos, um andar eqüino e aumento dos nervos peroneais. Ela apresentava dificuldade para andar sobre os dedos e não podia andar sobre os calcanhares. Sob outros aspectos, os achados de seu exame eram normais Como parte de sua avaliação, o neurologista solicitou vários estudos, incluindo velocidades de condução nervosa (NCV). As NCV de J T eram anormais; sua NCV média era de 25 m/s (normal é > 43 m/s) Os resultados de uma subseqüente biópsia de nervos mostrou desmielinização segmentar, hipertrofia da bainha da mielina (envolvimento redundante das células de Schwann ao redor das fibras nervosas) e nenhuma evidência de inflamação O neurologista explicou que estes resultados eram fortemente sugestivos de uma neuropatia desmielinizante tal como a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 (CMT1), também conhecida como neuropatia hereditária motora e sensorial tipo 1 Explicando que a causa mais comum de CMT1 é uma duplicação do gene da proteína 22 de mielina periférica (*PMP22*), o neurologista solicitou um teste para esta duplicação. Este teste confirmou que J.T tinha uma duplicação do alelo *PMP22* e a doença CMT1A.

Bases

Etiologia da Doença

A CMT é um grupo geneticamente heterogêneo de neuropatias hereditárias caracterizado por polineuropatia crônica motora e sensorial. A CMT foi então subdividida de acordo com os padrões de herança, neuropatologia e características clínicas. Por definição, a CMT1 é uma neuropatia desmielinizante autossômica dominante. Ela tem uma prevalência de cerca de 15 em 100.000 e também é geneticamente heterogênea. A CMT1 é mais comumente causada pelo aumento de dosagem de PMP22 secundária a uma duplicação do gene *PMP22* no cromossomo 17. Esta duplicação contribui com 70% da CMT1 geral e 90% dos casos esporádicos de CMT1. Mais de 90% das duplicações *de novo* surgem durante a meiose masculina.

Patogenia

A PMP22 é uma glicoproteína integrante da membrana. Dentro do sistema nervoso periférico, a PMP22 é encontrada na mielina compacta, mas não na não-compacta A função da PMP22 ainda não foi totalmente esclarecida, mas as evidências sugerem que ela tem um papel importante na compactação da mielina.

Mutações dominantes negativas dentro de *PMP22* ou aumento de dosagem de PMP22 causam uma polineuropatia periférica desmielinizante. O aumento de dosagem de PMP22 surge por duplicação em tandem na banda p11.2 do cromossomo 17. Esta região de 1,5 megabase (Mb) é flanqueada por seqüências repetidas de DNA que são aproximadamente 98% idênticas. O desalinhamento destes elementos repetidos flanqueadores durante a meiose pode levar a um *crossing over* desigual e à formação de uma cromátide com uma duplicação da região de 1,5 Mb e outra com a deleção recíproca. (A deleção recíproca causa a doença neuropatia hereditária com paralisias de pressão [HNPP].) Uma pessoa que herde uma cromátide com a duplicação terá três cópias de um gene *PMP22* normal e, portanto, uma hiperexpressão de PMP22.

A hiperexpressão de PMP22 ou a expressão das formas dominantes negativas de PMP22 resulta na incapacidade de formar e manter a mielina compacta. As amostras de biópsia de nervos de crianças gravemente afetadas mostram uma escassez difusa de mielina, e as amostras de biópsias de nervos de pacientes mais brandamente afetados mostram desmielinização segmentar e bainha de mielina hipertrofiada O mecanismo de expressão pelo qual a hiperexpressão de PMP22 causa esta patologia permanece obscuro.

A fraqueza muscular e a atrofia observadas na CMT1 resultam de desnervação muscular secundária à degeneração axonal. Os estudos longitudinais de pacientes mostraram uma redução dependente de idade da densidade da fibra nervosa correlacionada ao desenvolvimento dos sintomas da doença. Além disso, as evidências de modelos murinos sugerem que a mielina é necessária para a manutenção do citoesqueleto axonal. O mecanismo pelo qual a desmielinização altera o citoesqueleto axonal e causa a degeneração axonal ainda não foi totalmente elucidado

Fenótipo e História Natural

A CMT1A tem penetrância quase total, embora a gravidade, o início e a progressão da CMT1 variem acentuadamente dentro e dentre as famílias. Muitos indivíduos afetados não procuram cuidados médicos, seja porque seus sintomas não são notáveis seja porque seus sintomas são facilmente acomodados. Por outro lado, outros têm a doença grave, que se manifesta na lactância ou na infância.

Os sintomas da CMT1A em geral se desenvolvem nas primeiras duas décadas de vida O início após os 30 anos de idade é raro. É típico que os sintomas comecem insidiosamente e progridam de modo lento em uma fraqueza e atrofia dos músculos distais das pernas e um leve prejuízo sensorial (Fig. C.10). A fraqueza dos pés e das pernas leva a anomalias do andar, pé em gota e, eventualmente, deformidades do pé (pés *cavus* e artelhos em martelo) e perda do equilíbrio. Raramente faz com que os pacientes percam a capacidade de andar. A fraqueza dos músculos da mão em geral ocorre mais tarde no curso da doença e, nos casos graves, causa deformidades de mão em garra. Outros achados associados incluem diminuição ou ausência de reflexos, ataxia das extremidades superiores e tremor, escoliose e nervos aumentados superficialmente palpáveis. Ocasionalmente, os nervos frênicos e autônomos também são envolvidos

Nos estudos eletrofisiológicos, o marco principal da CMT1A é uma diminuição uniforme da NCV em todos os nervos e segmentos nervo-

A expansão do trecho de poliglutaminas da HD parece conferir um ganho de função deletério. Além da atrofia grave e difusa do neoestriado, que é o marco da HD, a expressão da huntingtina mutante causa disfunção neuronal, atrofia cerebral generalizada, mudanças nos níveis de neurorreceptores e acúmulo de agregados neuronais e citoplasmáticos. Finalmente, a expressão da huntingtina mutante leva à morte neuronal. Entretanto, os estudos de modelos murinos sugerem que os sintomas clínicos e a disfunção neuronal precedem o desenvolvimento de agregados intracelulares e a morte neuronal. Além disso, os estudos em camundongos sugerem que a expressão do trecho expandido de poliglutaminas é não só necessária como suficiente para a indução de um fenótipo similar à HD. Compatível com esta observação, o desligamento da expressão do trecho expandido de poliglutaminas em camundongos que apresentam um fenótipo similar à HD resulta na resolução de muitas características da HD. O mecanismo pelo qual a expressão desta expansão de poliglutaminas causa HD ainda não está claro.

Fenótipo e História Natural

A idade do paciente no início da doença é inversamente proporcional ao número de repetições CAG de *HD*. Os pacientes com doença de início na vida adulta têm de 40 a 55 repetições, enquanto aqueles com doença de início juvenil em geral têm mais de 60 repetições. Os pacientes com 36 a 41 repetições CAG de *HD* apresentam penetrância reduzida. Isto é, eles podem ou não desenvolver HD durante a vida. Além da relação com a idade de início, o número de repetições não está correlacionado a outras características da HD.

A instabilidade no número de repetições CAG dentro dos alelos mutantes de *HD* em geral resulta na antecipação, isto é, idades de início progressivamente mais jovens com gerações sucessivas. Uma vez que o número de repetições CAG é de 36 ou mais, o tamanho da repetição CAG em geral se expande durante a transmissão paterna. As expansões durante a transmissão materna são menos freqüentes e mais curtas que as expansões durante a transmissão paterna. Como o tamanho da repetição CAG é inversamente correlacionado à idade de início, as pessoas que herdam uma mutação por parte do pai têm um risco aumentado de desenvolver a doença de início mais cedo. Aproximadamente 80% dos pacientes juvenis herdam o gene *HD* mutante do pai.

Cerca de um terço dos pacientes apresenta anomalias psiquiátricas. Dois terços se apresentam com uma combinação de perturbações cognitivas e motoras. A idade média de apresentação nos pacientes é de 35 a 44 anos. Entretanto, cerca de um quarto dos pacientes desenvolve HD após os 50 anos e um décimo, antes dos 20 anos (ver Cap. 12). A sobrevida média após o diagnóstico é de 15 a 18 anos, e a média de idade na morte é de 54 a 55 anos.

A HD é caracterizada por progressivas anomalias motoras, cognitivas e psiquiátricas. As perturbações motoras envolvem tanto os movimentos voluntários quanto os involuntários. Inicialmente, estes movimentos interferem pouco nas atividades diárias, mas em geral tornam-se incapacitantes à medida que a HD progride. A coréia, que está presente em mais de 90% dos pacientes, é o movimento involuntário mais comum e caracteriza-se por contorções não-periódicas e não-repetitivas que não podem ser suprimidas voluntariamente. As anomalias cognitivas começam cedo no curso da doença e afetam todos os aspectos da cognição. A linguagem em geral é afetada mais tarde que as outras funções cognitivas. Os distúrbios comportamentais, que em geral se desenvolvem mais tarde no curso da doença, incluem desinibição social, agressão, explosões temperamentais, apatia, desvio sexual e aumento de apetite. As manifestações psiquiátricas, que podem se desenvolver a qualquer momento do curso da doença, incluem mudanças de personalidade, psicose afetiva e esquizofrenia.

Nos estágios finais da HD, os pacientes em geral desenvolvem graves prejuízos motores, que os tornam totalmente dependentes dos outros. Eles também apresentam perda de peso, distúrbios do sono, incontinência e mutismo. Seus distúrbios comportamentais diminuem à medida que a doença avança.

Tratamento

Atualmente, não está disponível nenhum tratamento curativo para a HD. A terapia enfoca o cuidado de apoio, bem como o tratamento farmacológico dos problemas comportamentais e neurológicos.

Risco de Herança

Cada filho de um paciente com HD tem um risco de 50% de herdar um alelo *HD* mutante. Exceto para os alelos com penetrância incompleta (de 36 a 41 repetições CAG), todos os filhos que herdam o alelo mutante de *HD* desenvolverão HD se tiverem um tempo de vida normal.

Os filhos de pais com pré-mutações têm um risco empírico de aproximadamente 3% de herdar um alelo de *HD* no qual a pré-mutação se expandiu para uma mutação total. Entretanto, nem todos os homens portadores de uma pré-mutação têm a mesma probabilidade de transmitir uma mutação total.

Os testes pré-sintomáticos e pré-natais estão disponíveis por meio da análise do número de repetições CAG dentro do exon 1 do gene *HD*. Os testes pré-sintomáticos e pré-natais são uma forma preditiva de teste e são mais bem interpretados após a confirmação de uma expansão CAG em um membro familiar afetado.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Os pacientes com mutações heterozigotas e homozigotas de *HD* têm expressão clínica similar de HD, enquanto as pessoas com deleções de um alelo *HD* no cromossomo 4p têm um fenótipo normal. Como isto pode ser explicado?
2. Alguns estudos sugerem que um pai com uma pré-mutação e um filho afetado tem um risco mais alto de transmitir uma mutação total que um pai com uma pré-mutação e nenhum filho afetado. Discuta os mecanismos possíveis para esta predisposição em transmitir as mutações *HD*.
3. A expansão de pré-mutações de *HD* para mutações totais ocorre pela linhagem germinativa masculina, enquanto a expansão das pré-mutações de *FMR1* (síndrome do X frágil) para mutações totais ocorre pela linhagem germinativa feminina. Discuta os possíveis mecanismos para as predileções de sexo na transmissão da doença.
4. Por consenso internacional, as crianças em risco e assintomáticas não são testadas para mutações *HD*, pois o teste não permite que a criança escolha saber ou não, o teste resulta na exposição da criança a uma estigmatização familiar e social e os resultados do teste podem afetar as decisões educacionais e de carreira. Quando seria apropriado testar as crianças assintomáticas em risco? Que avanços na medicina são necessários para fazer com que os testes de todas as crianças em risco sejam aceitáveis? (Considere o raciocínio subjacente à triagem neonatal.)

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Doença de Tay-Sachs

(Mutação HEXA)

Autossômica Recessiva

Fundamentos

- Doença de armazenamento lisossômico
- Variação étnica nas freqüências alélicas
- Deriva genética
- Pseudodeficiência
- Triagem populacional

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da lactância até a vida adulta
- Neurodegeneração
- Ponto vermelho-cereja na retina
- Psicose

História e Achados Físicos

R.T. e S.T., uma dupla de judeus Ashkenazi, foram encaminhados a uma clínica de genética para avaliação de seu risco de ter um filho com doença de Tay-Sachs. S.T. tinha uma irmã que morreu de Tay-Sachs quando criança. R.T. tinha um tio paterno vivendo em uma instituição psiquiátrica, mas ele não sabia que doença seu tio tinha. Sob outros aspectos, a história familiar era normal. Tanto R.T. quanto S.T. tinham se recusado a fazer uma triagem para a condição de portador de Tay-Sachs quando adolescentes. Os testes enzimáticos mostraram que tanto R.T. quanto S.T. tinham atividade extremamente reduzida de hexosaminidase A. A análise molecular subseqüente das mutações *HEXA* predominantes em judeus Ashkenazi confirmou que S.T. tinha uma mutação causadora da doença, enquanto R.T. tinha uma pseudodeficiência alélica, mas não a mutação causadora da doença.

Bases

Etiologia da Doença

A doença de Tay-Sachs, gangliosidose G_{M2} infantil, é um distúrbio panétnico autossômico recessivo do catabolismo de gangliosídeos que é causado por uma deficiência de hexosaminidase A (ver Cap. 12). Além de uma grave doença de início infantil, a deficiência de hexosaminidase A causa uma doença mais branda, que tem início juvenil ou adulto.

A incidência da deficiência de hexosaminidase A varia amplamente entre populações diferentes. A incidência da doença de Tay-Sachs varia de 1 em 3 600 nascimentos de judeus Ashkenazi a 1 em 360 000 nascimentos de norte-americanos judeus não-Ashkenazi. Os franco-canadenses, os Cajuns da Louisiana e os Amish da Pensilvânia têm uma incidência de Tay-Sachs comparável à dos judeus Ashkenazi. O aumento da freqüência de portadores nestas quatro populações parece ser secundário à deriva genética.

Patogenia

Os gangliosídeos, um tipo de esfingoglicolipídeos, são um grupo de oligossacarídeos de ceramida que têm pelo menos uma unidade de ácido siálico. Os gangliosídeos residem em todas as membranas de superfície celular, mas são mais abundantes no cérebro. O conteúdo e a distribuição dos gangliosídeos variam amplamente entre as regiões cerebrais, os tipos celulares e os domínios de superfície celular. Os gangliosídeos estão concentrados nas membranas da superfície neuronal, particularmente nos dendritos e terminais axônicos. Eles funcionam como receptores de vários hormônios glicoproteicos e toxinas bacterianas e estão envolvidos na diferenciação celular e na interação célula-célula.

A hexosaminidase A é uma enzima lisossômica que é composta de duas subunidades. A subunidade α está codificada pelo gene *HEXA* no cromossomo 15 e a subunidade β, pelo gene *HEXB* no cromossomo 5. Na presença da proteína ativadora, a hexosaminidase A remove o terminal N-acetilgalactosamina do gangliosídeo G_{M2}. As mutações da subunidade α ou a proteína ativadora causam o acúmulo de G_{M2} no lisossomo e, assim, a doença de Tay-Sachs ou uma variante. (A mutação da subunidade β causa a doença de Sandhoff.). O mecanismo pelo qual o acúmulo de gangliosídeo G_{M2} causa a morte neural ainda não foi totalmente definido, embora, por analogia com as doenças de Gaucher e Krabbe, os produtos tóxicos de G_{M2} (p. ex., lisogangliosídeo G_{M2}) possam efetuar a neuropatologia.

O nível de atividade residual de hexosaminidase A está inversamente correlacionado com a gravidade da doença. Os pacientes com início infantil de gangliosidose G_{M2} têm dois alelos nulos, isto é, nenhuma atividade enzimática de hexosaminidase A. Os pacientes com as formas juvenil ou de início adulto de gangliosidose G_{M2} em geral são compostos para um alelo nulo *HEXA* e um alelo com atividade residual de hexosaminidase A.

Fenótipo e História Natural

A gangliosidose G_{M2} de início infantil é caracterizada pela deterioração neurológica, que começa entre os 3 a 6 meses e progride até a morte, aos 2 a 4 anos. O desenvolvimento motor em geral atinge o topo ou começa a regredir aos 8 a 10 meses e progride para a perda de movimentos voluntários no segundo ano de vida. A perda visual começa no primeiro ano e progride de maneira rápida. Quase uniformemente está associada a um ponto "vermelho-cereja" no exame fundoscópico (Fig. C.12). As convulsões em geral começam ao final do primeiro ano e pioram progressivamente. A posterior deterioração, no segundo ano de vida, resulta em uma postura descerebrada, dificuldades de deglutição, piora das convulsões e, finalmente, estado vegetativo, sem respostas.

Manifestando-se entre os 2 e os 4 anos e progredindo até a morte, em geral na segunda década, a gangliosidose G_{M2} de início juvenil é caracterizada pela deterioração neurológica, que começa com ataxia e descoordenação. Ao final da primeira década, a maioria dos pacientes tem espasticidade e convulsões. Entre os 10 e 15 anos, a maioria desenvolve rigidez descerebrada e entra em estado vegetativo. A perda de visão não está consistentemente associada a um ponto vermelho-cereja. A atrofia óptica e a retinite pigmentosa em geral ocorrem mais tarde no curso da doença.

A gangliosidose G_{M2} de início adulto exibe uma acentuada variabilidade clínica (distonia progressiva, degeneração espinocerebelar, doença de neurônios motores ou anomalias psiquiátricas). Até 40% dos pacientes têm manifestações psiquiátricas progressivas sem demência. A visão raramente é afetada, e o exame oftalmológico geralmente é normal.

Tratamento

O diagnóstico de uma gangliosidose G_{M2} é baseado na demonstração tanto da ausência ou quase ausência de atividade de hexosaminidase A no soro ou glóbulos brancos quanto na atividade de normal a elevada de hexosaminidase B. A análise de mutação do gene *HEXA* também pode ser usada para diagnóstico, mas é mais tipicamente reservada para esclarecer a condição de portadora e teste pré-natal.

A doença de Tay-Sachs é atualmente um distúrbio incurável. Portanto, o tratamento enfoca os sintomas e cuidados paliativos. Quase todos

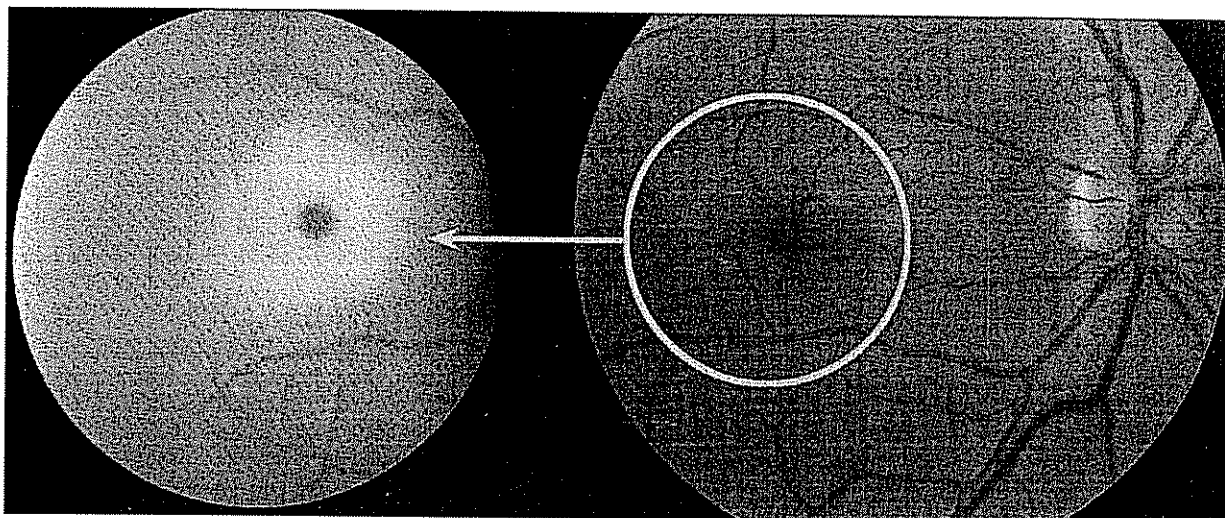



Fig. C.12 Ponto vermelho-cereja na doença de Tay-Sachs À *direita* uma retina normal O *círculo* rodeia a mácula, lateral ao nervo óptico A imagem à *esquerda* mostra a mácula de uma criança com doença de Tay-Sachs O centro "vermelho-cereja" é a retina normal da fóvea no centro da mácula que é circundada pela retina macular tornada branca pela estocagem anormal de G_{M2} nos neurônios retinais (Cortesia de A V Levin, Hospital for Sick Children e University of Toronto)

os pacientes precisam de tratamento farmacológico para as convulsões. As manifestações psiquiátricas dos pacientes com gangliosidose G_{M2} de início adulto em geral não respondem a medicações antipsicóticas ou antidepressivas; o lítio e a terapia eletroconvulsiva é o que há de mais efetivo

Risco de Herança

Para genitores em potencial sem uma história familiar de gangliosidose G_{M2}, seu risco empírico de ter um filho afetado pela doença depende da freqüência de gangliosidose G_{M2} em seus grupos étnicos. Para a maioria dos norte-americanos, o risco empírico de ser um portador é de aproximadamente 1 em 250 a 1 em 300, enquanto para os judeus Ashkenazi o risco empírico de ser um portador é de aproximadamente 1 em 30. Para casais que são portadores, o risco de ter um filho com gangliosidose G_{M2} é de 1 em 4.

O diagnóstico pré-natal é baseado na identificação de mutações *HEXA* ou deficiência de hexosaminidase A em tecidos fetais, como vilosidades coriônicas ou amniócitos. A identificação efetiva de fetos afetados pela análise de mutação *HEXA* em geral requer que as mutações responsáveis pela gangliosidose G_{M2} em uma família já tenham sido identificadas.

A triagem das populações de alto risco para portadores e a subseqüente prevenção têm reduzido a incidência da doença de Tay-Sachs entre os judeus Ashkenazi em quase 90%. Tradicionalmente, tal triagem é feita pela determinação da atividade sérica de hexosaminidase A usando um substrato artificial Esta sensível dosagem, entretanto, não pode distinguir as mutações patológicas e a pseudodeficiência (catabolismo reduzido do substrato artificial, mas catabolismo normal do substrato natural). Portanto, o estado de portador geralmente é confirmado por análise molecular de *HEXA*. Dois alelos de pseudodeficiências e mais de 70 mutações patológicas foram identificados em *HEXA*. Entre os judeus Ashkenazi que são positivos por triagem enzimática de portadores, 2% são heterozigotos para um alelo de pseudodeficiência e de 95% a 98% são heterozigotos para uma das três mutações patológicas, duas causando início infantil e uma causando início adulto de gangliosidose G_{M2}. Em contraste, entre os norte-americanos não-judeus que são positivos por triagem enzimática de portadores, 35% são heterozigotos para um alelo de pseudodeficiência.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. A triagem de quais outras doenças é complicada pela "pseudodeficiência"?
2. Cite duas outras doenças que exibam deriva genética. O que é deriva genética? Quais as causas da deriva genética?
3. A triagem populacional deve ser instituída para identificar portadores de outras doenças?
4. Que doenças são genocópias de deficiência de hexosaminidase A de início adulto? Considere os distúrbios psiquiátricos e a lipofuscinose ceróide neuronal. A deficiência de hexosaminidase A de início infantil? Considere as mutações ativadoras de G_{M2}. Como você distinguiria uma genocópia de uma deficiência de hexosaminidase A?

Referências

GeneClinics
http://www genedinics org/

Doença do Rim Policístico

(Mutações PKD1 e PKD2)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Expressividade variável
- Heterogeneidade genética
- Hipótese de dois eventos

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da infância até a vida adulta
- Insuficiência renal progressiva
- Cistos hepáticos
- Aneurismas saculares intracranianos
- Prolapso de valva mitral
- Divertículo colônico

História e Achados Físicos

Há quatro meses, P J., uma mulher de 35 anos de idade com uma história de prolapso de valva mitral, desenvolveu dor intermitente no flanco Ela foi ao departamento de emergência local com dor intensa e hematúria. Um ultra-som renal mostrou nefrolitíase e rins policísticos compatíveis com doença renal policística. Os achados de seu exame físico foram normais, exceto por um sopro sistólico compatível com prolapso de valva mitral, hipertensão branda e leve elevação de creatinina sérica Seu pai e sua irmã haviam morrido de rompimento de aneurismas intracranianos, e o filho de P.J. havia morrido com 1 ano de idade de doença do rim policístico Na época da morte de seu filho, os médicos haviam dito que P.J. e seu marido deviam ser avaliados para ver se um deles tinha doença do rim policíscito Entretanto, os genitores não quiseram fazer esta avaliação por causa da culpa e do sofrimento quanto à morte do filho P J. foi internada para tratamento da nefrolitíase. Durante esta internação, os nefrologistas disseram a P J que ela tinha doença do rim policístico autossômica dominante (ADPKD)

Bases

Etiologia da Doença

A ADPKD é geneticamente heterogênea. Aproximadamente 85% dos pacientes têm mutações no gene *PKD1* (ADPKD-1), enquanto a maioria dos restantes tem mutações de *PKD2* (ADPKD-2). Algumas famílias não mostraram ligação com nenhum destes loci, sugerindo que existe pelo menos um locus adicional que ainda não foi identificado.

A ADPKD é um dos distúrbios genéticos mais comuns e tem uma prevalência de 1 em 300 a 1 em 1 000 entre todas as raças estudadas. Nos EUA, ela contribui com 8% a 10% das doenças renais em estágio final.

Patogenia

O *PKD1* codifica a policistina-1, uma proteína transmembrana tipo receptor de função desconhecida. O *PKD2* codifica a policistina-2, uma proteína integral da membrana com homologia aos canais de sódio e cálcio $\alpha 1$ ativados por voltagem. A policistina-1 e a policistina-2 podem interagir como parte de um complexo heteromultimérico

A formação de cistos na ADPKD parece seguir o mecanismo de "dois eventos", tal como o observado com os genes de supressão tumoral e a neoplasia (ver Cap 16). Isto é, ambos os alelos, seja de *PKD1* seja de *PKD2*, devem perder a funcionalidade para que se formem os cistos. O mecanismo pelo qual a perda de função da policistina-1 ou da policistina-2 causa a formação de cistos ainda não foi definido.

Fenótipo e História Natural

A ADPKD pode se manifestar em qualquer idade, mas com mais freqüência os sintomas surgem na terceira ou quarta décadas de vida Os pacientes apresentam-se com infecções das vias urinárias, hematúria, obstrução das vias urinárias (coágulos ou nefrolitíase), noctúria, hemorragia em um cisto renal ou queixas de dor no flanco pelo efeito de massa dos rins aumentados (Fig. C 13). A hipertensão afeta de 20% a 30% das crianças com ADPKD e quase 75% dos adultos com ADPKD A hipertensão é um efeito secundário da isquemia intra-renal e da ativação do sistema renina-angiotensina. Quase metade dos pacientes desenvolvem doença renal em estágio final aos 60 anos de idade A hipertensão, as infecções recorrentes das vias urinárias, o sexo masculino e a idade precoce dos sintomas são bem preditivos de insuficiência renal inicial. Aproximadamente 43% dos pacientes que apresentam ADPKD antes ou logo após o nascimento morrem de insuficiência renal dentro do primeiro ano de vida. Os sobreviventes desenvolvem doença renal em estágio final ou hipertensão, ou ambos, aos 30 anos de idade

A ADPKD exibe variação tanto inter- quanto intrafamiliar na idade de início e na gravidade Parte da variação interfamiliar é secundária à heterogeneidade genética, porque os pacientes com ADPKD-2 têm uma doença mais branda que os pacientes com ADPKD-1. A variação intrafamiliar parece resultar de uma combinação de um fundo ambiental e genético, pois a variabilidade é mais acentuada entre as gerações que entre os irmãos

Além dos cistos renais, os pacientes com ADPKD desenvolvem cistos hepáticos, pancreáticos, ovarianos e esplênicos, bem como aneurismas intracranianos, prolapso de valva mitral e divertículos colônicos Os cistos hepáticos são comuns tanto na ADPKD-1 quanto ADPKD-2, enquanto os cistos pancreáticos em geral são observados na ADPKD-1. De 5% a 10% dos pacientes com ADPKD desenvolvem aneurismas

Fig. C.13 Foto de um corte de um rim de um paciente com doença do rim policístico autossômica dominante (Cortesia de J Rutledge. Department of Pathology. University of Washington. Seattle)

saculares intracranianos. Entretanto, nem todos os pacientes têm um risco igual para desenvolvê-los, pois os aneurismas apresentam agrupamento familiar. Os pacientes com ADPKD têm um risco aumentado de insuficiência valvar aórtica e tricúspide e aproximadamente 25% deles desenvolvem prolapso de valva mitral. Os divertículos colônicos são as anomalias extra-renais mais comuns. Os divertículos associados à ADPKD têm mais probabilidade de perfurar do que aqueles observados na população geral.

Tratamento

Em geral, a ADPKD é diagnosticada pela história familiar e por ultra-som renal. A detecção de cistos renais por ultra-som aumenta com a idade, de tal modo que aos 20 anos de 80% a 90% dos pacientes têm cistos detectáveis e aos 30 anos quase 100% os têm. Se necessário para diagnóstico pré-natal ou identificação de um doador de rim compatível, o diagnóstico pode ser confirmado pela detecção de ligação ou da mutação, ou ambos, em algumas famílias.

A conduta e o tratamento dos pacientes com ADPKD enfocam a diminuição da progressão da doença renal e a diminuição dos sintomas. A hipertensão e as infecções das vias urinárias são tratadas agressivamente, a fim de preservar o funcionamento renal. A dor pelo efeito de massa dos rins aumentados em geral é tratada por drenagem e esclerose dos cistos.

Risco de Herança

Noventa por cento dos pacientes têm uma história familiar de ADPKD. Os genitores com ADPKD têm um risco de 50% de ter um filho afetado em cada gestação. Se os genitores já tiverem tido um filho com início da doença ainda no útero, o risco de terem outro gravemente afetado é de cerca de 25%. Em geral, entretanto, a gravidade da doença não pode ser prevista por causa da expressividade variável. Nas famílias nas quais a mutação é conhecida, ou nas quais a análise de ligação é possível, o risco de recorrência pode ser modificado pela análise do DNA fetal.

Os irmãos e genitores de pacientes com ADPKD também têm um risco aumentado da doença. Apenas 10% da ADPKD resulta de mutações *de novo* de *PDK1* ou *PDK2*. O ultra-som renal é o método recomendado para a triagem dos membros familiares.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Compare o mecanismo molecular do desenvolvimento de cistos na ADPKD com o desenvolvimento de neurofibromas na neurofibromatose tipo 1.
2. Muitas doenças mendelianas têm expressividade variável que pode ser causada por loci modificadores. Como se poderiam identificar tais loci?
3. Por que a ADPKD é freqüentemente associada à esclerose tuberosa? Como isto pode ilustrar uma síndrome de deleção de genes contíguos?
4. Como a ADPKD pode ser distinta da doença do rim policístico autossômica recessiva?
5. A análise de ligação das famílias que segregam ADPKD requer a participação de membros familiares, além do paciente. O que deve ser feito se as pessoas cruciais para o estudo não desejarem participar?

Referências

Wu G, Somlo S (2000) Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. Mol Genet Metab 69:1–15.

Epilepsia Mioclônica com Fibras Vermelhas Anfractuadas

(Mutação em *t*RNA^lis^ Mitocondrial)

Matrilinear, Mitocondrial

Fundamentos

- Mutações no DNA mitocondrial
- Segregação replicativa
- Limiar de expressão
- Alta taxa de mutação
- Acúmulo de mutações com a idade

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da infância à vida adulta
- Miopatia
- Demência
- Convulsões mioclônicas
- Ataxia
- Surdez

História e Achados Físicos

R S., um menino de 15 anos, foi encaminhado a uma clínica de neurogenética devido à epilepsia mioclônica Seu encefalograma foi caracterizado por acúmulos de ondas lentas e picos complexos. Antes que as convulsões se desenvolvessem, ele havia estado bem e se desenvolvera normalmente Sua história familiar foi marcante por um tio materno que havia morrido de um distúrbio miopático não-diagnosticado aos 53 anos; uma tia materna com demência progressiva que havia se apresentado com ataxia aos 37 anos e uma avó materna de 80 anos com surdez, diabetes e disfunção renal Ao exame, R S tinha perda muscular generalizada e fraqueza, mioclonia e ataxia A avaliação inicial detectou perda auditiva neurossensorial, velocidade de condução nervosa diminuída e níveis levemente elevados de lactato no sangue e líquido cérebro-espinhal Os resultados de uma biópsia muscular subseqüente identificaram mitocôndrias anormais, coloração deficiente para citocromo oxidase e fibras vermelhas anfractuadas — fibras musculares com mitocôndrias subsarcolêmicas que se coravam de vermelho com tricrômico de Gomori Os testes moleculares para mutações dentro do genoma mitocondrial (mtDNA) identificaram uma mutação (G8344A, gene de *t*RNA^lis^) que está associada à epilepsia mioclônica com fibras vermelhas anfractuadas (MERRF) Os testes subseqüentes de amostras de sangue da mãe de R S., da tia e da avó confirmaram que elas também tinham esta mutação Uma revisão da autópsia do tio falecido identificou as fibras vermelhas anfractuadas em alguns grupos de músculos O médico informou aos membros desta família que eles eram ou manifestantes ou portadores não-manifestantes de uma mutação deletéria no mtDNA que comprometia a fosforilação oxidativa (OXPHOS) Nenhum outro membro da família submeteu-se ao teste para esta mutação

Bases

Etiologia da Doença

A MERRF é um raro distúrbio pan-étnico que é causado por mutações dentro do mtDNA Mais de 90% dos pacientes têm uma mutação (G8344A ou T8356C) dentro do gene de *t*RNA^lis^ mitocondrial. A doença é herdada maternamente, pois as mitocôndrias são herdadas apenas da mãe (ver Cap 5)

Patogenia

As mitocôndrias geram energia para os processos celulares pela produção de adenosina trifosfato por OXPHOS Cinco complexos enzimáticos, de I a V, constituem a via OXPHOS Com exceção do complexo II, cada complexo tem alguns componentes codificados pelo mtDNA e alguns no genoma nuclear. O mtDNA codifica 13 dos polipeptídeos nos complexos de OXPHOS, bem como 2 rRNAs e 22 tRNAs (ver Cap 12)

Na MERRF, as atividades dos complexos I e IV são incomumente reduzidas de modo mais drástico As mutações de *tRNA*^lis^ associadas à MERRF reduzem a quantidade de tRNA^lis^ carregado nas mitocôndrias em 50% a 60% e, portanto, diminuem a eficiência da tradução, de tal modo que em cada códon de lisina há uma chance de 26% de término. Como os complexos I e IV têm a maioria dos componentes sintetizados dentro das mitocôndrias, eles são mais gravemente afetados

Como cada mitocôndria contém múltiplos mtDNA e cada célula contém muitas mitocôndrias, uma célula pode conter mtDNA de um genótipo (homoplasmia) ou múltiplos genótipos (heteroplasmia) Assim, a expressão do fenótipo MERRF em qualquer célula, órgão ou indivíduo depende da redução geral na capacidade de OXPHOS O limiar para a expressão de um fenótipo deletério depende do equilíbrio entre o fornecimento oxidativo e a demanda Este limiar varia com a idade e entre os indivíduos, sistemas orgânicos e tecidos

O limiar de expressão do fenótipo MERRF pode ser atingido seja pela diminuição da eficiência de expressão do mtDNA normal seja pelo aumento da proporção do mtDNA mutante Em contraste com o DNA nuclear, o mtDNA tem uma taxa de mutação 10 vezes maior Isto pode resultar da exposição a uma alta concentração de radicais livres de oxigênio da OXPHOS, uma falta de histonas protetoras e um reparo de DNA ineficiente Como o mtDNA não tem íntrons, as mutações aleatórias em geral afetam as seqüências codificantes Compatível com esta taxa de mutação aumentada, a eficiência mitocondrial declina gradativamente durante a vida adulta, e à medida que a reserva de OXPHOS declina, a expressão dos defeitos de OXPHOS torna-se cada vez mais provável

Os aumentos na proporção do mtDNA mutante podem ocorrer por uma combinação de herança, replicação preferencial do mtDNA mutante e seleção Primeiro, os filhos de mães heteroplásmicas têm proporções muito variáveis de genótipos de mtDNA devido à segregação replicativa, isto é, repartição aleatória de mitocôndrias durante a expansão da população de ovogônias Segundo, à medida que as células heteroplásmicas de uma pessoa sofrem mitose, a proporção de genótipos de mtDNA nas células filhas fica diferente daquela da célula original por segregação replicativa Terceiro, como as mudanças na proporção dos genótipos de mtDNA afetam o fenótipo celular, o mtDNA está sujeito a fortes pressões seletivas As pressões seletivas variam entre os tecidos e resultam em populações diferentes de mtDNA em tecidos diferentes da mesma pessoa Assim, a transmissão da mtDNA tanto intercelular quanto entre as gerações segue os princípios da genética de populações

Fenótipo e História Natural

O fenótipo clássico da MERRF inclui epilepsia mioclônica e miopatia mitocondrial com fibras vermelhas anfractuadas (Fig C.14) Outros achados associados incluem respostas evocadas anormais do tronco cerebral, perda de audição sensorial neural, ataxia, disfunção renal, diabetes, cardiomiopatia e demência. O início dos sintomas pode ser na infância ou na vida adulta, e o curso pode ser de progresso lento ou rápido

Como a genética do mtDNA segue princípios quantitativos e estocásticos, as características clínicas dos parentes afetados variam em padrão e gravidade e não têm um curso clínico facilmente definido A ausência de fibras vermelhas anfractuadas em uma amostra de biópsia muscular não exlui a MERRF Nos heredogramas, os fenótipos em geral estão bem correlacionados com a gravidade do déficit de OXPHOS.

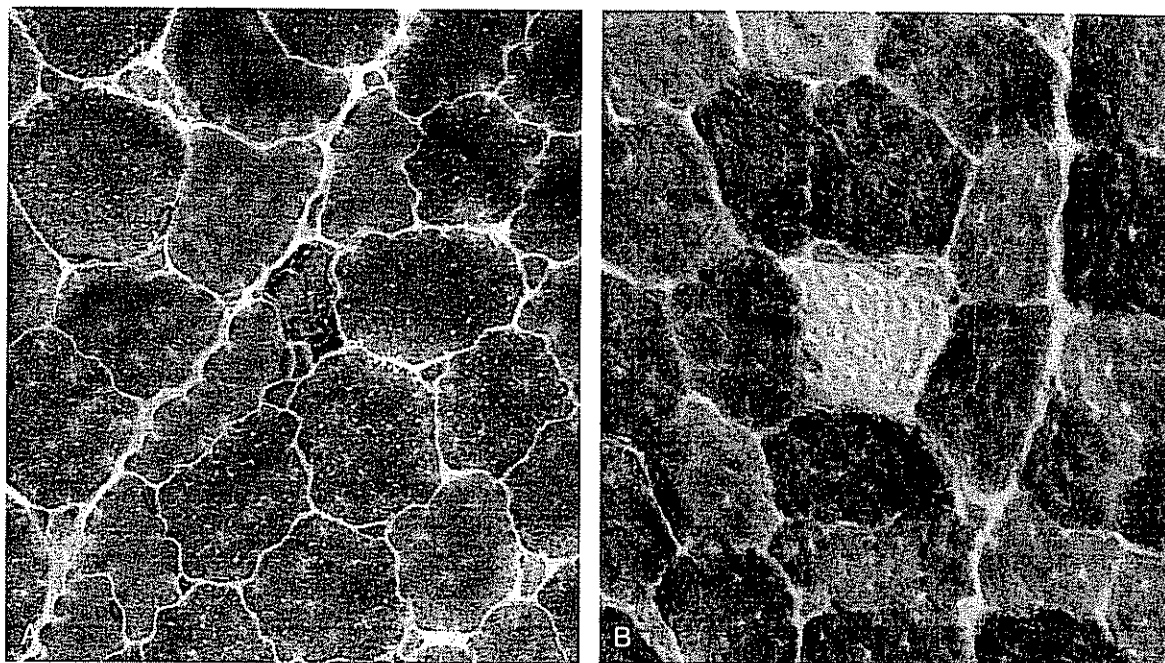



Fig. C.14 Histologia do músculo quadríceps. *A*, Coloração com tricrômico de Gomori modificada ilustrando a fibra vermelha anfractuada. O aumento é de 525 ×. *B*, Coloração de citocromo oxidase ilustrando a ausência de citocromo oxidase em uma fibra muscular afetada, consistente com um defeito no DNA mitocondrial. O aumento é de 525 ×. (Cortesia de Annette Feigenbaum, The Hospital for Sick Children e University of Toronto.)

mas a correlação com a porcentagem de mtDNA mutante no músculo esquelético requer um ajuste por idade. Em um heredograma, um adulto jovem com 5% de mtDNA normal nos músculos esqueléticos tinha um grave fenótipo clínico e bioquímico; outros adultos jovens com 15% de mtDNA normal tinham fenótipos normais e um adulto idoso com 16% de mtDNA normal tinha um fenótipo intenso. Este padrão de expressão demonstra que os sintomas acumulam-se progressivamente, à medida que a capacidade de OXPHOS cai abaixo do limiar de expressão do órgão, e que este declínio relacionado à idade em OXPHOS tem um papel crucial no aparecimento e na progressão dos sintomas.

Tratamento

O tratamento é sintomático e paliativo. Nenhuma terapia específica está disponível atualmente. A maioria dos pacientes recebe suplementos vitamínicos para otimizar a atividade dos complexos OXPHOS.

Risco de Herança

O risco para filhos de homens afetados é zero, pois os filhos não herdam o mtDNA paterno. O risco para filhos de mulheres afetadas ou não-afetadas com uma mutação MERRF não pode ser estimado com acurácia por testes pré-natais, pois os parâmetros críticos que definem a doença na criança (segregação replicativa, seleção tecidual e mutações somáticas no mtDNA) não podem ser previstos com antecedência.

De modo semelhante, os testes moleculares de amostras de sangue de membros de uma família em risco são complicados por dois problemas gerais. Primeiro, em função da segregação replicativa e da seleção de tecidos, a mutação pode não ser detectável no sangue. Assim, um resultado negativo não exclui um membro da família como portador da mutação do mtDNA. Segundo, em função da segregação replicativa, um resultado positivo não pode prever nem a proporção do mtDNA mutante em outros tecidos nem a gravidade que se pode esperar da doença.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Como uma molécula de mtDNA mutante, que surge em uma célula com centenas de moléculas normais, torna-se uma fração do total tão significativa que a capacidade de geração de energia é comprometida e surgem os sintomas?
2. Como as mutações mitocondriais que afetam a fosforilação oxidativa podem acelerar a taxa de mutação do mtDNA?
3. Como as mutações mitocondriais que afetam a fosforilação oxidativa aceleram o envelhecimento?
4. No feto, a tensão de oxigênio é baixa e a maior parte da energia é derivada da glicólise. Como esta observação afeta a expressão pré-natal das mutações deletérias de OXPHOS?

Referências

Nyhan WL, Ozand PT (1998) Myoclonic epilepsy and ragged red fiber (MERRF) disease. *In* Atlas of Metabolic Diseases. Chapman & Hall Medical, New York, pp. 292–296

Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. Science 283:1482–1488.

Fibrose Cística

(Mutação CFTR)

Autossômica Recessiva

Fundamentos

- Variação étnica na freqüência da mutação
- Expressividade variável
- Expressão histoespecífica das mutações
- Modificadores genéticos
- Modificadores ambientais

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da neonatal à vida adulta
- Doença pulmonar progressiva
- Insuficiência pancreática exócrina
- Azoospermia obstrutiva
- Cloreto elevado no suor
- Falta de crescimento
- Mecônio íleo

História e Achados Físicos

J.B., uma menina de 2 anos, foi encaminhada à clínica pediátrica para avaliação do pouco crescimento. Durante a lactância, J.B. tinha tido diarréia e colite que se resolveram quando uma fórmula elementar substituiu sua fórmula padrão. Ela desenvolveu fezes malcheirosas, contendo partículas de alimento, quando alimentos comuns foram adicionados à sua dieta. Durante seu segundo ano, J.B. cresceu pouco, desenvolveu uma tosse crônica e teve freqüentes infecções respiratórias. Ninguém mais na família tinha pouco crescimento, distúrbios de alimentação ou doenças pulmonares. No exame físico, o peso de J.B. e sua altura estavam abaixo do 3.° percentil e a circunferência de sua cabeça, no 10.° percentil. Ela apresentava um grave exantema causado pela fralda, ruídos brônquicos difusos e leve baqueteamento dos dedos. Sob outros aspectos, os achados de seu exame eram normais. Após uma breve discussão de algumas possíveis causas da doença de J.B., o pediatra solicitou vários testes, incluindo um teste para o nível de cloreto no suor. O nível de cloreto no suor era de 75 mmol/L, um nível compatível com a fibrose cística (CF) (normal, 40 mmol/L; indeterminado, de 40 a 60 mmol/L). Com base neste resultado e no curso clínico, o pediatra diagnosticou a condição de J.B. como sendo CF. Os genitores e J.B. foram encaminhados a uma clínica de CF para outras informações e tratamento.

Bases

Etiologia da Doença

A CF é um distúrbio autossômico recessivo do transporte epitelial de íons causado por mutações no gene regulador de condutância transmembranar (*CFTR*). Embora a CF tenha sido observada em todas as raças, é predominantemente uma doença dos europeus do nordeste. A incidência de CF em nativivos varia de 1 em 313 entre os Huteritas do sudeste de Alberta, no Canadá, a 1 em 90.000 entre as populações asiáticas do Havaí.

Patogenia

O CFTR é um canal de cloreto regulado por cAMP que regula outros canais iônicos. O CFTR mantém a hidratação de secreções dentro das vias aéreas e dos dutos por meio da excreção de cloreto e da inibição de captação de sódio (ver Cap. 12).

A disfunção de CFTR pode afetar muitos órgãos diferentes, em particular os que secretam muco, incluindo as vias respiratórias superiores e inferiores, o pâncreas, o sistema biliar, a genitália masculina, o intestino e as glândulas sudoríparas.

As secreções desidratadas e viscosas nos pulmões dos pacientes com CF interferem na limpeza mucociliar, inibindo o funcionamento de peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural, criando um meio de crescimento para organismos patogênicos e obstruindo o fluxo de ar. Nos primeiros meses de vida, estas secreções e as bactérias que as colonizam iniciam uma reação inflamatória. A liberação de citocinas inflamatórias, de enzimas antibacterianas do hospedeiro e de enzimas bacterianas danifica os bronquíolos. Os ciclos recorrentes de infecção, inflamação e destruição tissular diminuem a quantidade de tecido pulmonar funcional e, eventualmente, levam à insuficiência respiratória (Fig. C.15).

A perda de transporte de cloreto por CFTR para o duto pancreático impede a hidratação de secreções e leva à retenção de enzimas exócrinas no pâncreas. Os danos causados por estas enzimas retidas eventualmente causam fibrose do pâncreas.

Fig. C.15 Foto de um corte mediano de um pulmão de um paciente com fibrose cística. Notar os acúmulos de muco e secreções purulentas dentro das vias aéreas. (Cortesia de J. Rutledge, University of Washington e Children's Hospital e Medical Center, Seattle.)

O CFTR também regula a captação de sódio e cloreto do suor à medida que eles se movem pelo duto sudoríparo. Na ausência de CFTR funcional, o suor tem um conteúdo aumentado de cloreto de sódio, e esta é a base da histórica "síndrome da criança salgada" e do diagnóstico do teste de cloreto do suor.

Fenótipo e História Natural

A CF manifesta-se classicamente no início da infância, embora cerca de 4% dos pacientes sejam diagnosticados na vida adulta. De 10% a 20% dos pacientes apresentam mecônio íleo ao nascimento e os demais apresentam queixas respiratórias crônicas (rinite, sinusite ou doença pulmonar obstrutiva, ou ambas) ou pouco crescimento, ou ambos, mais tarde na vida. O pouco crescimento resulta de uma combinação do aumento de gasto calórico decorrente das infecções pulmonares crônicas e da má nutrição causada por insuficiência pancreática exócrina. De 5% a 15% dos pacientes com CF com doença pulmonar não desenvolvem insuficiência pancreática. Mais de 95% dos pacientes masculinos com CF são azoospérmicos devido à obliteração ou à falta de desenvolvimento dos dutos de Wolff. A progressão da doença pulmonar é o principal determinante de morbidade e mortalidade. A maioria dos pacientes morre de insuficiência respiratória e *cor pulmonale* entre os 30 e 40 anos de idade.

Além da CF, as mutações dentro do *CFTR* foram associadas a um espectro de doenças, incluindo azoospermia obstrutiva, pancreatite idiopática, bronquiectasia disseminada, aspergilose broncopulmonar alérgica, doença sinopulmonar atípica e asma. Alguns destes distúrbios estão associados a mutações dentro de um único alelo de *CFTR*, enquanto outras, como a CF, são observadas com mutações em ambos os alelos de *CFTR*. Um papel causal direto para os alelos mutantes de *CFTR* foi estabelecido para alguns destes distúrbios, mas não para todos.

Só existe correlação entre determinados alelos mutantes de *CFTR* e a gravidade da doença para a insuficiência pancreática. Mutações secundárias ou polimorfismos dentro de um alelo de *CFTR* podem alterar a eficiência do processamento ou da maturação da proteína e, portanto, ampliar o espectro da doença associada a algumas mutações. Além disso, algumas mutações são predominantemente expressas em alguns tecidos; por exemplo, algumas mutações que afetam a eficiência da recomposição (*splicing*) têm um efeito maior na expressão de CFTR nos derivados do duto de Wolff que em outros tecidos. Fatores ambientais, como exposição ao fumo de cigarros, pioram muito a gravidade da doença pulmonar entre os pacientes com CF.

Tratamento

Como quase 900 mutações diferentes e variantes foram descritas no gene *CFTR*, o diagnóstico da CF na América do Norte em geral é baseado em critérios clínicos e concentração de cloreto do suor. De 1% a 2% dos pacientes com CF têm concentrações normais de cloreto. Nestes pacientes, entretanto, as diferenças de potencial transepitelial em geral são diagnósticas de CF.

Atualmente, não existem tratamentos curativos para a CF, embora um melhor tratamento sintomático tenha aumentado a longevidade média do início da infância para entre 30 e 40 anos. Os objetivos da terapia médica para CF são a remoção das secreções pulmonares, o controle da infecção pulmonar, uma nutrição adequada e a prevenção da obstrução intestinal. Embora a terapia médica melhore a progressão da doença pulmonar, o único tratamento efetivo para a insuficiência respiratória na CF é o transplante de pulmão. A reposição da enzima pancreática e a suplementação das vitaminas lipossolúveis tratam efetivamente a má absorção. Devido ao aumento das necessidades calóricas e da anorexia, entretanto, muitos pacientes precisam de suplementos calóricos. A maioria dos pacientes também precisa de muita informação para lidar com os efeitos psicológicos de ter uma doença crônica fatal.

Risco de Herança

O risco empírico de um casal ter uma criança afetada por CF varia muito dependendo da freqüência da CF em seus grupos étnicos. Para os norte-americanos que não têm uma história familiar de CF e têm ancestrais do nordeste da Europa, o risco empírico de cada um ser um portador é de cerca de 1 em 25, e o risco deste casal ter um filho afetado é, portanto, de 1 em 2.500. Para casais que já tiveram uma criança afetada por CF, o risco de filhos futuros terem CF é de 1 em 4.

O diagnóstico pré-natal é baseado na identificação das mutações de *CFTR* no DNA de tecido fetal, como vilosidades coriônicas ou amniocentese. A identificação efetiva dos fetos afetados em geral requer que as mutações responsáveis pela CF em uma família já tenham sido identificadas.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Como alguns estudos sugerem que a intervenção nutricional e possivelmente médica antes do desenvolvimento dos sintomas melhora a qualidade de vida, os testes de triagem para as crianças afetadas ou pais portadores, ou ambos, atualmente estão sendo considerados e realizados. Que critérios o teste de triagem de um neonato para CF deve atender para que seja implementado?
2. A mutação mais comum de CF é a ΔF508. Ela corresponde a cerca de 70% de todos os alelos mutantes de *CFTR*. Para um casal de origem do nordeste da Europa, qual o risco de ter um filho afetado, se cada um for negativo para ΔF508? E se um for positivo e outro negativo para ΔF508?
3. O que constitui a doença, uma mutação em um gene ou o fenótipo causado por esta mutação? A detecção de uma mutação no gene *CFTR* de pacientes com ausência bilateral congênita de *vas deferens* significa que eles têm CF?

Referências

Cystic Fibrosis Mutation Data Base
http://www genet sickkids. on.ca/cftr/

Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic fibrosis. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp. 5121–5188.

Hemofilia

(Mutação F8C ou F9)

Ligada ao X

Fundamentos
- Terapia de reposição
- Recombinação intracromossômica
- Inserção de elemento de transposição
- Expressividade variável

Principais Características Fenotípicas
- Idade de início: da lactância até a vida adulta
- Diátese hemorrágica
- Hemartroses
- Hematomas

História e Achados Físicos
S T , uma mulher saudável com 38 anos, solicitou uma consulta a respeito de seu risco de ter um filho com hemofilia Ela tinha um tio materno que havia morrido na infância de hemofilia e um irmão que tinha tido problemas de sangramento quando criança Os problemas de sangramento de seu irmão tinham sido resolvidos durante a adolescência Nenhum outro membro da família tinha distúrbios de sangramento O geneticista explicou a S T que sua história familiar sugeria uma anomalia ligada ao X da coagulação, tal como a hemofilia A ou B, e que a melhora de seu irmão era particularmente sugestiva da variante da hemofilia B fator IX de Leyden Para confirmar o diagnóstico de hemofilia, o geneticista disse a S T que seu irmão devia ser avaliado primeiro, porque a identificação de um portador isolado é difícil S T falou com o irmão, e ele concordou com a avaliação A revisão de seus registros médicos mostrou que ele de fato havia sido diagnosticado com deficiência de fator IX quando criança, mas agora tinha níveis plasmáticos quase normais de fator IX A análise de mutação do DNA confirmou que ele tinha uma mutação no promotor do gene *F9*, compatível com o fator IX de Leyden Testes subseqüentes de S T mostraram que ela não tinha uma mutação idêntica à de seu irmão

Bases

Etiologia da Doença
As hemofilias A e B são distúrbios ligados ao X da coagulação causados por mutações nos genes *F8C* e *F9*, respectivamente As mutações de *F8C* causam uma deficiência ou disfunção do fator VIII de coagulação As mutações de *F9* causam uma deficiência ou disfunção do fator IX de coagulação

A hemofilia é um distúrbio pan-étnico sem predileção racial A hemofilia A tem uma incidência de 1 em 5 000 a 10 000 meninos neonatos A hemofilia B é muito mais rara, com uma incidência de 1 em 100 000

Patogenia
O sistema de coagulação mantém a integridade da vasculatura por meio de um delicado equilíbrio entre a formação e a inibição de coágulo As proteases e os co-fatores de proteína que compõem a cascata de coagulação estão presentes na circulação como precursores inativos e devem ser subseqüentemente ativados no local do dano para formar um coágulo de fibrina O tempo e a formação eficiente do coágulo requerem uma ativação exponencial ou amplificação da cascata de proteases Os fatores VIII e IX de coagulação, que se juntam, são fundamentais para esta amplificação Eles ativam o fator de coagulação X, e o fator X ativo, por sua vez, ativa mais fator IX e fator VIII O fator IX funciona como uma protease e o fator VIII, como um co-fator A deficiência ou disfunção do fator IX ou do fator VIII causa hemofilia

As mutações de *F8C* incluem deleções, inserções, inversões e mutações de ponto A mutação mais comum é uma inversão que deleta o terminal carboxila do fator VIII Ela contribui com 25% de todas as hemofilias A e com 40% a 50% das hemofilias A graves Esta inversão resulta de uma recombinação intracromossômica entre as seqüências situadas no íntron 22 de *F8C* e as seqüências homólogas teloméricas de *F8C* Uma classe curiosa de mutação envolve a retrotransposição de repetições L1 no gene Para todas as mutações *F8C*, a atividade enzimática residual do complexo fator VIII-fator IX está correlacionada à gravidade da doença clínica

Muitas mutações *F9* diferentes foram identificadas em pacientes com hemofilia B, mas, em contraste à freqüente inversão parcial de *F8C* na hemofilia A, uma mutação *F9* comum não foi identificada para hemofilia B O fator IX de Leyden é uma variante *F9* incomum causada por mutações de ponto no promotor de *F9* Está associado com níveis muito baixos de fator IX e hemofilia grave durante a infância, mas a resolução espontânea da hemofilia ocorre na puberdade, quando os níveis de fator IX ficam quase normais Para cada mutação *F9*, a atividade enzimática residual do complexo fator VIII-fator IX está correlacionada à gravidade da doença clínica

Fenótipo e História Natural
A hemofilia é classicamente uma doença masculina, embora raras mulheres sejam afetadas devido ao desvio de inativação do cromossomo X Clinicamente, as hemofilias A e B são indistinguíveis Ambas são caracterizadas por sangramento nos tecidos moles, nos músculos e nas articulações de sustentação de peso (Fig C 16) O sangramento ocorre em horas ou dias após um trauma e, em geral, continua por dias ou semanas Aqueles com doença grave geralmente são diagnosticados quando neonatos, em função de excessivos cefalematomas ou sangramento prolongado de feridas umbilicais ou circuncisão Os pacientes com doença moderada em geral não desenvolvem hematomas ou hemartroses até que comecem a engatinhar ou andar e, portanto, escapam do diagnóstico até esta época Os pacientes com doença branda freqüentemente se apresentam na adolescência ou vida adulta com hemartroses ou sangramento prolongado após cirurgia ou trauma

As hemofilias A e B são diagnosticadas e diferenciadas pela dosagem dos níveis de atividade dos fatores VIII e IX Tanto para hemofilia A quanto para a B o nível de atividade do fator VIII ou do fator IX indica a gravidade clínica

Classificação	% de Atividade (Fator VIII ou IX)
Grave	< 5%
Moderada	1% - 5%
Branda	5% - 25%

Tratamento
Embora as atuais tentativas de terapia gênica sejam muito promissoras, nenhum tratamento curativo está disponível para as hemofilias A e B, exceto o transplante de fígado Atualmente, o tratamento padrão é a reposição intravenosa do fator deficiente A terapia de reposição do fator aumentou a expectativa de vida de uma média de 1,4 ano no início da década de 1900 para aproximadamente 65 anos hoje em dia

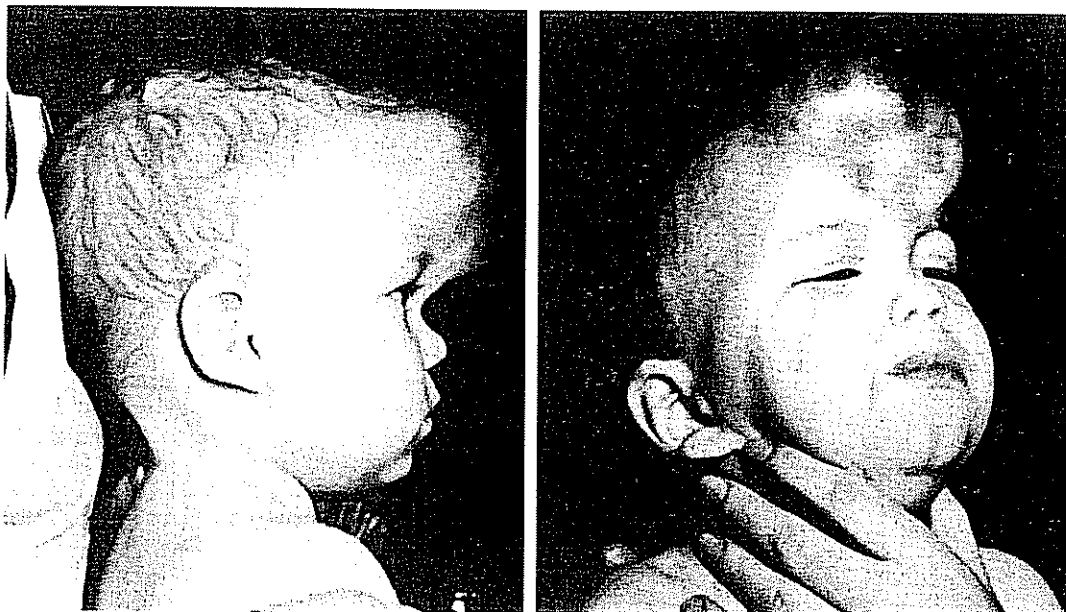



Fig. C.16 Hematoma subcutâneo na testa de um menino com hemofilia A foto foi tirada 4 dias após uma pequena contusão O aspecto da testa voltou ao normal em 6 meses (Adaptado de Stefanini M., Dameshek W [1962] The Hemorrhagic Disorders: A Clinical and Therapeutic Approach, Grune & Stratton, New York, p 252, com permissão Restauração fotográfica por cortesia de B Moseley-Fernandini)

Risco de Herança

Se uma mulher tem uma história familiar de hemofilia, sua condição de portadora pode ser determinada pela análise de ligação ou pela identificação de mutação *F8C* ou *F9* segregando-se na família A identificação rotineira de mutações está disponível apenas para a inversão comum *F8C* A identificação de portadoras pela dosagem enzimática é difícil e não está amplamente disponível.

Se uma mulher é portadora, cada filho tem um risco de 50% de ter hemofilia e cada filha tem um risco de 50% de herdar a mutação *F8C* ou *F9*. Refletindo a freqüência de desvio da inativação do cromossomo X, as filhas que herdam uma mutação *F8C* ou *F9* têm um risco baixo de hemofilia.

Se uma mãe tem um filho com hemofilia mas nenhum outro parente afetado, seu risco *a priori* de ser uma portadora é de 2 em 3, pois aproximadamente um terço dos pacientes tem uma mutação nova em *F8C* ou *F9* Pela aplicação do teorema de Bayes, este risco pode ser modificado considerando-se o número de filhos não-afetados na família (ver Cap 19).

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Que outras doenças são causadas por recombinação entre seqüências repetidas de nucleotídeos? Compare e contraste o mecanismo de recombinação observado na hemofilia A com aquele observado na síndrome de Smith-Magenis e na hipercolesterolemia familiar (mutações de receptor de lipoproteína de baixa densidade).
2. Uma das mutações mais incomuns em *F8C* é a inserção do elemento L1 no exon 14 Quais são os elementos de transposição? Como os elementos de transposição se movem dentro do genoma? Cite outra doença causada por movimento de elementos de transposição
3. Qual a hipótese de Haldane? Cite duas outras doenças que são compatíveis com esta hipótese.
4. Nos pacientes com fator IX de Leyden, por que a deficiência do fator IX se resolve durante a puberdade?
5. Compare e contraste a reposição enzimática para hemofilia com a da doença de Gaucher Cerca de 10% dos pacientes com hemofilia desenvolvem um título de anticorpo clinicamente significativo contra o fator VIII ou IX Por quê? Há uma predisposição genética ao desenvolvimento de anticorpos contra os fatores de reposição? Como esta reação imune pode ser evitada? A terapia gênica seria útil para os pacientes com anticorpos?
6. Discuta os enfoques atuais para a terapia gênica na hemofilia B.

Referências

GeneClinics
http://www genedinics org/

Kay MA, Manno CS, Ragni MV (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat Genet 24:257–261.

Hipercolesterolemia Familiar

(Mutação de Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Modificadores ambientais
- Efeitos do fundador
- Dosagem gênica
- Modificadores genéticos

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início:
  Heterozigotos: Início da vida adulta média
  Homozigotos: Infância
- Hipercolesterolemia
- Aterosclerose
- Xantomas
- Arcos na córnea

História e Achados Físicos

L.L., antes um saudável poeta de 45 anos franco-canadense, estava internado em decorrência de um infarto do miocárdio. Ele tinha um pequeno xantoma no tendão de Aquiles direito. Seu irmão também tinha doença cardíaca coronariana (CHD). Sua mãe, avó materna e dois tios maternos haviam morrido de CHD. Além de sua história familiar e do sexo, seus fatores de risco de CHD e aterosclerose incluíam um nível elevado de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), uma leve obesidade, inatividade física e tabagismo. Baseado em sua história familiar, L.L. foi tido como tendo uma forma autossômica dominante de hipercolesterolemia. Confirmando esta suspeita, a análise molecular revelou que ele era heterozigoto para uma deleção na ponta 5' do gene de receptor de LDL (*LDLR*), uma mutação encontrada em 59% dos franco-canadenses com hipercolesterolemia familiar (FH). A triagem de seus filhos revelou que dois dos três filhos tinham níveis elevados de LDL-colesterol. O cardiologista explicou a L.L. que, além de uma terapia com drogas, o tratamento efetivo de sua CHD exigia mudanças dietéticas e de estilo de vida, tais como uma dieta pobre em gordura saturada e baixa em colesterol, aumento de atividade física, perda de peso e parar de fumar. L.L. não seguiu o tratamento e morreu um ano depois em decorrência de um infarto do miocárdio.

Bases

Etiologia da Doença

A FH é um distúrbio autossômico dominante do colesterol e do metabolismo de lipídios causado por mutações em *LDLR*. A FH ocorre em todas as raças e tem uma prevalência de 1 em 200 a 1 em 1.000 na maioria das populações caucasianas. Ela contribui com cerca de menos de 5% dos pacientes com hipercolesterolemia (ver Cap. 12).

Patogenia

O receptor de LDL, uma glicoproteína transmembranar predominantemente expressa no fígado e no córtex adrenal, tem um papel importante na homeostasia de colesterol. Ele liga apo B-100, a única proteína de LDL, e apo E, uma proteína encontrada nas lipoproteínas de baixa densidade, nas lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), nos restos de quilomícrons e em algumas lipoproteínas de alta densidade. Os receptores de LDL hepático depuram aproximadamente 50% de IDL e de 66% a 80% de LDL da circulação por endocitose. As pouco compreendidas vias independentes do receptor de LDL removem o LDL restante.

As mutações associadas à FH ocorrem no *LDLR*. De 2% a 10% são grandes inserções, deleções ou rearranjos mediados por recombinação entre as repetições *Alu* dentro do *LDLR*. Algumas mutações parecem ser dominantes negativas. A maioria das mutações é privada, embora algumas populações, tais como os libaneses, os franco-canadenses, os índios do sudeste da África, os judeus Ashkenazi do sudeste da África e os africânderes, tenham mutações comuns e uma alta prevalência de doenças devido a efeitos do fundador.

As mutações homozigotas ou heterozigotas de *LDLR* diminuem a eficiência da endocitose de IDL e LDL e causam o acúmulo de LDL plasmático pelo aumento da produção de LDL a partir de IDL e pela diminuição da depuração hepática de IDL. Os elevados níveis plasmáticos de IDL causam ateroesclerose pelo aumento da depuração de LDL pelas vias independentes do receptor de LDL, tais como a endocitose de LDL oxidado por macrófagos e histiócitos. Os monócitos, que se infiltram na íntima arterial e a endocitose de LDL oxidado, formam células espumosas e liberam citocinas que causam a proliferação das células dos músculos lisos da média arterial. Inicialmente, as células dos músculos lisos produzem colágeno suficiente e proteínas da matriz para formar uma capa fibrosa sobre as células espumosas. Entretanto, como as células espumosas continuam a endocitose de LDL oxidado, as células espumosas eventualmente rompem a capa fibrosa para a luz arterial, ativando a formação de trombos. Tal formação de trombos é uma causa comum de derrames e infarto do miocárdio.

O ambiente, o sexo e a constituição genética modificam o efeito das mutações do receptor de LDL no nível do LDL do plasma e, portanto, a ocorrência de aterosclerose. A dieta é o principal modificador ambiental dos níveis plasmáticos de LDL. A maioria dos heterozigotos para FH da Tunísia tem níveis de LDL "normais para os norte-americanos" e raramente desenvolve doença cardiovascular e xantomas. Similarmente, os heterozigotos chineses para FH que vivem na China raramente têm xantomas e doença cardiovascular, enquanto os heterozigotos chineses para FH que vivem nas sociedades ocidentais têm manifestações clínicas similares às dos heterozigotos caucasianos para FH. O colesterol dietético suprime a síntese dos receptores de LDL e, portanto, eleva os níveis de LDL plasmático. Este efeito do colesterol dietético é potenciado por ácidos graxos saturados, tais como o palmitato de laticínios, e melhorado por ácidos graxos insaturados, tais como o oleato e o linoleato. Como uma dieta similar não eleva os níveis de LDL igualmente entre os pacientes, outros fatores ambientais e genéticos também devem influenciar o metabolismo de LDL. Apoiando um modificador genético, algumas famílias com FH segregam um locus autossômico dominante que reduz o LDL do plasma.

Fenótipo e História Natural

A hipercolesterolemia, o primeiro achado de FH, em geral se manifesta ao nascimento e é o único achado clínico da primeira década. Em todas as idades, a concentração de colesterol plasmático é maior que o 95° percentil em mais de 95% dos pacientes. O arco na córnea e os xantomas nos tendões começam a aparecer no final da segunda década e, ao morrer, 80% dos heterozigotos para FH têm xantomas (Fig. C.17). Quase 40% dos pacientes adultos têm poliartrite não-progressiva recorrente e tenossinovite. Como tabulado acima, o desenvolvimento de CHD entre os heterozigotos para FH depende da idade e do sexo.

	% de Homens Afetados FH		% de Mulheres Afetadas FH	
Idade	*CHD*	*Morte*	*CHD*	*Morte*
30	5	—	0	—
40	20-24	—	0-3	0
50	45-51	25	12-20	2
60	75-85	50	45-57	15
70	100	80	75	30

Tratamento

O colesterol LDL plasmático elevado e uma história familiar de hipercolesterolemia, xantomas ou CHD prematura sugerem fortemente um diagnóstico de FH. No entanto, a confirmação do diagnóstico é difícil, pois requer a quantificação do funcionamento dos receptores de LDL nos fibroblastos da pele do paciente ou a identificação da mutação em *LDLR*. Na maioria das populações, a grande quantidade de mutações em *LDLR* impede a análise direta do DNA, a menos que uma determinada mutação seja fortemente suspeita. Felizmente, um diagnóstico molecular definitivo de FH não nos fornece uma informação prognóstica ou terapêutica além da obtida pela história familiar e pela determinação do colesterol-LDL plasmático.

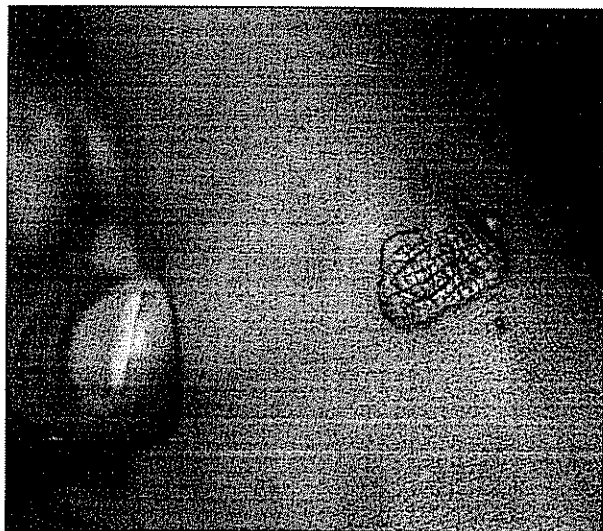



Fig. C.17 Foto de um xantoma no tendão de Aquiles de um paciente com hipercolesterolemia familiar. (Cortesia de M. L. Levy, Baylor College of Medicine e Texas Children's Hospital, Houston.)

Independente de terem FH, todos os pacientes com níveis elevados de colesterol-LDL precisam de uma agressiva normalização do colesterol-LDL para reduzir o risco de CHD. A rigorosa normalização do colesterol-LDL pode evitar e reverter a aterosclerose. Entre os heterozigotos para FH, a adesão rigorosa a uma dieta pobre em gordura e rica em carboidratos em geral produz uma redução de 10% a 20% do colesterol-LDL. Como esta redução em geral é insuficiente, os pacientes também são tratados com uma (ou uma combinação delas) das três classes de drogas: seqüestradores de ácidos biliares, inibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase e ácido nicotínico (ver Cap. 13). Além disso, o tratamento de mulheres após a menopausa com estrogênio reduz o colesterol-LDL. As recomendações atuais são o início da terapia com drogas aos 10 anos para os pacientes com um nível de colesterol-LDL de mais de 190 mg/dl e uma história familiar negativa de CHD prematura e também aos 10 anos para os pacientes com um nível de colesterol-LDL de mais de 160 mg/dl e uma história familiar positiva de CHD prematura.

Risco de Herança

Como a FH é um distúrbio autossômico dominante, cada filho de um genitor afetado tem um risco de 50% de herdar o alelo mutante de *LDLR*. Os heterozigotos não-tratados para FH têm um risco de 100% de desenvolver CHD aos 70 anos se forem homens e de 75%, se forem mulheres. A atual terapia médica reduz acentuadamente este risco pela normalização do colesterol plasmático.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Que informações a FH nos dá sobre as causas poligênicas mais comuns da aterosclerose e da CHD?
2. A apo B-100 defeituosa familiar é uma fenocópia da FH. Por quê?
3. Os óleos vegetais são hidrogenados para fazer margarina. Que efeito o consumo de margarina tem na expressão do receptor de LDL em comparação com o consumo de óleo vegetal?
4. Discuta a suscetibilidade genética à infecção e a potencial vantagem do heterozigoto no contexto do papel do receptor de LDL na infecção por hepatite C.

Referências

Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS (2001) Familial hypercholesterolemia. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2863–2914.

Holoprosencefalia (Forma Não-sindrômica)

(Mutação *Sonic Hedgehog*)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Gene regulador do desenvolvimento
- Heterogeneidade genética
- Mutações de efeito de posição
- Expressividade variável
- Penetrância variável

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: pré-natal
- Mau desenvolvimento do prosencéfalo ventral
- Dismorfismo facial
- Retardo de desenvolvimento

História e Achados Físicos

O dr D., um médido de 37 anos. compareceu a uma clínica de genética com sua esposa porque seu primeiro filho morreu ao nascimento com holoprosencefalia (HPE) A gestação havia transcorrido sem complicações e a criança tinha um cariótipo normal Nem ele nem sua esposa relataram qualquer problema médico O dr D havida sido adotado quando criança e não conhecera a história de sua família biológica A história familiar da família de sua esposa não sugeria nenhum distúrbio genético Um exame cuidadoso do dr D e de sua esposa mostrou que ele tinha ausência de frênulo labial superior e um leve hipotelorismo, mas sem outros achados dismórficos Seu médico explicou-lhe que a HPE em seu filho e sua ausência de frênulo labial superior e leve hipotelorismo sugeriam HPE autossômica dominante Os testes moleculares subseqüentes confirmaram que o dr D tinha uma mutação no gene *sonic hedgehog (SHH)*

Bases

Etiologia da Doença

A HPE, que tem uma incidência de nascimento de 1 em 10 000 a 1 em 20 000, é o defeito cerebral humano congênito mais comum Ele afeta duas vezes mais as meninas que os meninos

A HPE resulta de uma variedade de causas, incluindo distúrbios cromossômicos e monogênicos e fatores ambientais, como a diabetes materna O distúrbio ocorre tanto isoladamente quanto como uma característica de várias síndromes, como a síndrome de Smith-Lemli-Opitz A HPE familiar não-sindrômica exibe herança autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X Cerca de 25% a 50% de todas as HPE estão associadas a anomalias cromossômicas. A distribuição não-aleatória de anomalias cromossômicas prevê pelo menos 12 loci diferentes de HPE, incluindo 7q36, 13q32, 2p21, 18p11 3 e 21q22 3

O *SHH*, o primeiro gene identificado com mutações causadoras de HPE, está mapeado em 7q36. As mutações *SHH* contribuem com aproximadamente 30% a 40% da HPE autossômica dominante não-sindrômica familiar, mas com menos de 5% da HPE não-sindrômica geral

Patogenia

A Shh é uma proteína de sinal secretada necessária ao padrão de desenvolvimento tanto em mamíferos quanto em insetos (ver Cap 17)

As mutações humanas de *SHH* são mutações de perda de função Algumas das anomalias citogenéticas que afetam a expressão de *SHH* são translocações que ocorrem em 15 a 256 kb de 5' da região codificante de *SHH* Estas translocações são chamadas de mutações de "efeito de posição" porque elas não mutam a seqüência codificante, mas perturbam elementos reguladores distantes ou a estrutura da cromatina, ou ambos, e, portanto, alteram a expressão de *SHH*

Fenótipo e História Natural

A má-formação prosencefálica da HPE segue um contínuo de gravidade, mas em geral é subdividida em HPE alobar (sem evidência de uma fissura inter-hemisférica), HPE semilobar (apenas fissura inter-hemisférica posterior) e HPE lobar (separação ventricular e separação cortical quase completa) (Fig C 18) Entre os pacientes com HPE com um cariótipo normal, 63% têm HPE alobar, 28% têm HPE semilobar e 9% têm HPE lobar Outras má-formações do sistema nervoso central (CNS) comumente associadas incluem tálamos não-divididos, disgenesia do corpo caloso, bulbos olfativos hipoplásicos, bulbos e vias ópticas hipoplásicas e disgenesia hipofisária

O espectro do dismorfismo facial na HPE amplia-se de ciclopia a normal e em geral reflete a gravidade das má-formações do CNS As características dismórficas associadas, mas não-diagnósticas, à HPE incluem micro- ou macrocefalia, anoftalmia ou microftalmia, hipo- ou hipertelorismo, nariz dismórfico, anomalias palatinas, úvula bífida, incisivo central único e ausência de um frênulo labial superior

O retardo de desenvolvimento ocorre em quase todos os pacientes com HPE A severidade do retardo está correlacionada à gravidade da má-formação do CNS, isto é, os pacientes com imagens normais do cérebro em geral têm inteligência normal Além do retardo do desenvolvimento, os pacientes freqüentemente têm convulsões, disfunção do tronco cerebral e desregulação do sono

Entre os pacientes com HPE sem anomalias cromossômicas, a sobrevida varia inversamente à gravidade do fenótipo facial. Os pacientes com ciclopia ou etmocefalia em geral não sobrevivem uma semana Cerca de 50% dos pacientes com HPE alobar morrem antes de 4 a 5 meses de idade e 80% antes de um ano. Aproximadamente 50% dos pacientes com HPE lobar ou semilobar sobrevivem ao primeiro ano

Tratamento

Os pacientes com HPE necessitam de uma rigorosa avaliação logo nos primeiros dias de vida O tratamento é sintomático e de apoio. Além das preocupações médicas quanto ao paciente, uma grande parte da conduta inclui a informação e o apoio aos genitores, bem como a definição da causa da HPE

Risco de Herança

Em termos etiológicos, a HPE é extremamente heterogênea, e o risco de recorrência em uma família depende da identificação da causa subjacente As mães diabéticas têm um risco de 1% de ter um filho com HPE Para os genitores de um paciente com uma anomalia citogenética, o risco de recorrência depende de um deles ter uma anomalia citogenética que originou a anomalia do paciente Para os genitores de pacientes com HPE sindrômica, o risco de recorrência depende do risco de recorrência desta síndrome Na ausência de uma história familiar de HPE ou uma causa citogenética ou sindrômica de HPE, os genitores e irmãos devem ser examinados atentamente quanto a microformas, características sutis associadas à HPE, tais como frênulo ausente ou um único incisivo superior Para os genitores com uma história familiar negativa, sem causas identificáveis de HPE e sem microformas sugestivas de HPE autossômica dominante, o risco empírico de recorrência é de aproximadamente 4% a 5%

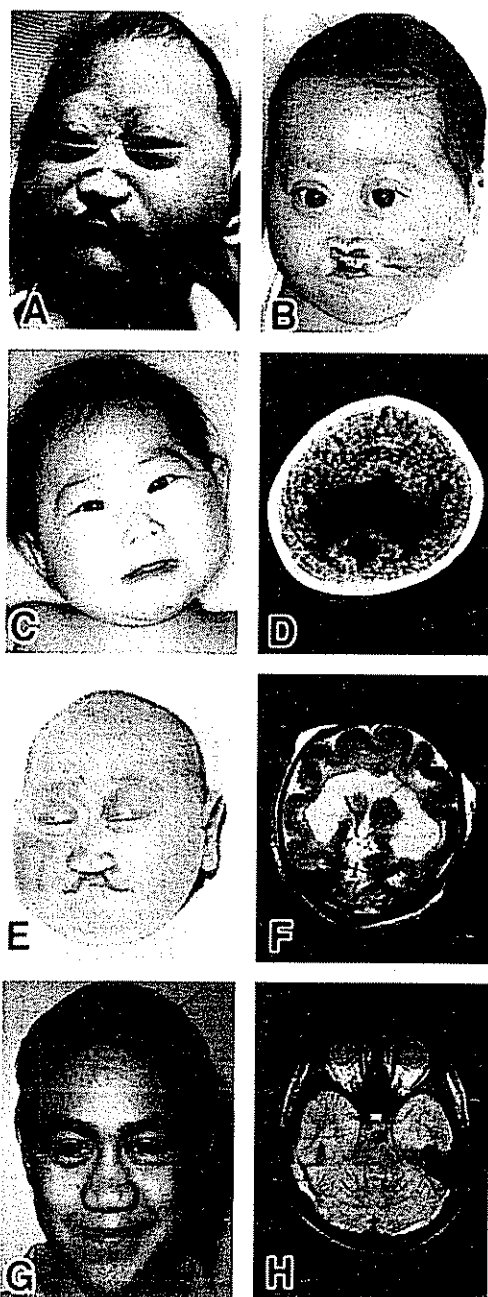



Fig. C.18 Holoprosencefalia (HPE) em pacientes com mutações *SHH* *A* Microcefalia, ausência de ossos nasais, fenda na linha média do palato e HPP semilobar *B*. HPE semilobar, agenesia pré-maxilar e fenda labial mediana *C*, *D*. Achados na face média com grave HPE semilobar na ressonância magnética (MRI) *E*, *F*. Microcefalia, globos oculares proeminentes, agenesia pré-maxilar e fenda labial, com HPE semilobar na MRI *G*, *H*. Microcefalia, hipertelorismo ocular, nariz achatado sem cartilagem palpável, hipoplasia da face média e *filtrum*, inteligência normal e MRI cerebral normal Todos os pacientes têm mutações *SHH* Os pacientes *A* e *B* também têm mutações de *TGIF*, e o paciente *C* também tem uma mutação em *ZIC2* As mutações *TGIF* indiretamente diminuem a expressão de Shh (Cortesia de M Muenke, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. Adaptado com permissão de Nanni L., Ming J. E., Bocian M., *et al* (1999) The mutational spectrum of the *Sonic Hedgehog* gene in holoprosencephaly: *SHH* mutations cause a significant portion of autosomal dominant holoprosencephaly Hum Mol Genet 8:2479)

Embora HPE autossômica recessiva e ligada ao X tenham sido relatadas, a maioria das famílias com um modo estabelecido de herança apresenta herança autossômica dominante A penetrância da HPE autossômica dominante é de aproximadamente 70% Entre os portadores obrigatórios de HPE autossômica dominante, o risco de ter um filho com HPE grave é de 16% a 21%, e o risco de ter um filho com uma microforma é de 13% a 14% O fenótipo do portador não afeta o risco de ter um filho afetado

O teste molecular para as mutações de HPE não está atualmente disponível como um serviço clínico A HPE grave pode ser detectada por ultra-som pré-natal entre a 16.ª e a 18.ª semanas de gestação

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1 Que fatores podem explicar a expressividade e a penetrância variáveis das mutações *SHH* entre os irmãos?

2. Discuta os distúrbios genéticos com predileção por um sexo e os mecanismos subjacentes a ela. Como exemplos, considere a síndrome de Rett para ilustrar a letalidade embrionária com predileção por sexo, a estenose pilórica para ilustrar a predileção por sexo na freqüência da doença e a doença coronariana na hipercolesterolemia familiar para ilustrar a predileção por sexo na gravidade da doença.

3 Considerando os muitos loci associados à HPE, discuta por que as mutações em genes diferentes originam fenótipos idênticos

4. Considerando que *GLI3* está na cascata de transdução de sinal de Shh, discuta por que a mutação de perda de função de *GLI3* não origina o mesmo fenótipo que as mutações de perda de função de *SHH*.

Referências

Ming JE, Roessler E, Muenke M (1998) Human developmental disorders and the sonic hedgehog pathway. Mol Med Today 4:343–349.

Muenke M, Beachy PA (2001) Holoprosencephaly. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp 6203–6230.

Leucemia Mielóide Crônica

(Ativação de Oncogene BCR-ABL)

Mutação Somática

Fundamentos

- Translocação cromossômica recíproca
- Ativação de oncogene
- Proteína de fusão
- Hipótese de mais de um evento

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: da meia-idade à avançada
- Leucocitose
- Esplenomegalia
- Fadiga e mal-estar

História e Achados Físicos

E S., uma mulher de 45 anos, apresentou-se a seu médico de família para seu exame anual. Ela estava em boa saúde e não tinha queixas específicas Ao exame, ela apresentava a ponta do baço palpável, mas nenhum outro achado anormal. Os resultados de seu hemograma completo inesperadamente apresentaram uma contagem de hemácias de 31 × 10^9/L e uma contagem de plaquetas de 650 × 10^9/L. O esfregaço de sangue periférico revelou basofilia e granulócitos imaturos. Seu médico encaminhou-a ao departamento de oncologia para uma outra avaliação Sua medula óssea estava hipercelular, com um aumento do número de células mielóides e megacariocíticas e uma proporção aumentada de células mielóides em relação às eritróides. A análise citogenética de sua medula identificou várias células mielóides com um cromossomo Philadelphia, der(22)t(9;22)(q34;q11 2). Seu oncologista explicou que ela estava com leucemia mielóide crônica (CML) e que a única terapia potencialmente curativa disponível era um transplante alogênico de medula óssea.

Bases

Etiologia da Doença

A CML é uma expansão clonal de células genitoras hematopoéticas transformadas que aumenta as células mielóides e eritróides e as plaquetas circulantes. A transformação de células genitoras ocorre pela expressão do oncogene *BCR-ABL*. A CML contribui com 15% da leucemia adulta e tem uma incidência de 1 a 2 por 100 000 A incidência ajustada por idade é maior nos homens que nas mulheres (1,3 a 1,7 para 1,0) (ver Cap 16)

Patogenia

Aproximadamente 95% dos pacientes com CML têm cromossomo Philadelphia e os demais têm translocações complexas ou variantes (ver Cap 16) O proto-oncogene Abelson (*ABL*), que codifica uma tirosina cinase não-receptora, reside em 9q34, e o trecho gênico de quebra (*BCR*), que codifica uma fosfoproteína, está em 22q11 Durante a formação do cromossomo Philadelphia, o gene *ABL* é rompido no íntron 1 e o gene *BCR* em uma das três regiões de quebra. Os fragmentos gênicos de *BCR* e *ABL* são unidos de ponta-cabeça no cromossomo derivativo 22 (Fig C.19) O gene de fusão *BCR-ABL* no cromossomo derivativo 22 gera uma proteína de fusão que varia de tamanho dependendo do tamanho do peptídeo Bcr ligado ao terminal amino.

Até agora, as funções normais de Abl e Bcr ainda não foram totalmente esclarecidas. Abl foi razoavelmente bem-conservada durante a evolução dos metazoários. Ela é encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma e como um produto miristolado associado à membrana citoplasmática interna. A abundância relativa de Abl nestes compartimentos varia entre os tipos celulares e em resposta aos estímulos Abl participa do ciclo celular, das respostas ao estresse, da sinalização de integrina e do desenvolvimento neural. Os domínios funcionais de Bcr incluem um motivo helicoidal para polimerização com outras proteínas, um domínio serina-treonina cinase, um domínio de troca GDP-GTP envolvido na regulação de membros da família ras e um domínio de ativação de guanosina trifosfato para regular Rac e Rho GTPases.

A expressão de Abl não resulta em transformação celular, enquanto a expressão da proteína de fusão Bcr-Abl sim. Os camundongos transgênicos que expressam Bcr-Abl desenvolvem leucemia aguda ao nascimento, e a infeção de camundongos normais com expressão de um retrovírus Bcr-Abl causa uma variedade de leucemias agudas e crônicas que dependem da constituição genética Em contraste com a Abl, Brc-Abl tem uma atividade constitutiva de tirosina cinase e está confinada ao citoplasma, onde se liga avidamente aos microfilamentos de actina. Bcr-Abl fosforila vários substratos citoplasmáticos e, portanto, ativa cascatas de sinalização que controlam o crescimento, a diferenciação e, possivelmente, a adesão de células hematopoéticas A ativação desregulada destas vias de sinalização resulta na proliferação desregulada

Fig. C.19 Hibridização *in situ* com fluorescência de uma sonda específica de locus em células metafásica e interfásica (inserção) para a deleção de t(9;22)(q34;q11 2) na leucemia mielóide crônica O DNA foi corado com DAPI A sonda é uma mistura de sondas de DNA para o gene *BCR* (*vermelho*) em 22q11 2 e para o gene *ABL* (*verde*) em 9q34 Nas células normais, o sinal verde é observado em ambos os homólogos do cromossomo 9 e o sinal vermelho é observado em ambos os homólogos do cromossomo 22 Nas células com t(9;22), um sinal verde é observado no cromossomo 9 normal (*setas*), um sinal vermelho no cromossomo 22 normal (*seta pequena*) e um sinal amarelo de fusão (*seta longa*), resultante da presença de sinais verde e vermelho juntos no cromossomo Philadelphia, como resultado da translocação de *ABL* para o cromossomo 22 derivativo (Cortesia de M M LeBeau e H T Abelson, University of Chicago)

da célula tronco hematopoética, na liberação de células imaturas da medula e, finalmente, em CML.

À medida que a CML progride, ela se torna progressivamente agressiva. Durante esta evolução, as células tumorais de 50% a 80% dos pacientes adquirem outras mudanças cromossômicas, como a trissomia do 8, i(17q) ou trissomia do 19, ou outro cromossomo Philadelphia, ou ambos. Além das mudanças citogenéticas, os genes supressores tumorais e proto-oncogenes freqüentemente também estão mutados na progressão da CML.

Fenótipo e História Familiar

A CML é uma doença bifásica ou trifásica. O estágio inicial ou crônico é caracterizado por um início insidioso, com subseqüente desenvolvimento de fadiga, mal-estar, perda de peso e aumento esplênico de mínimo a moderado. Com o tempo, a CML evolui tipicamente para uma fase acelerada e então para uma crise blástica, embora alguns pacientes progridam diretamente da fase crônica para a crise blástica. A progressão de CML inclui o desenvolvimento de anomalias cromossômicas adicionais dentro do tumor, leucocitose progressiva, anemia, trombocitose ou trombocitopenia, esplenomegalia crescente, febre e lesões ósseas. A crise blástica é uma leucemia aguda na qual os blastos podem ser mielóides, linfóides, eritróides ou indiferenciados. A fase acelerada é intermediária à fase crônica e à crise blástica.

Aproximadamente 85% dos pacientes são diagnosticados na fase crônica. Dependendo do estudo, a média de idade do diagnóstico varia de 45 a 65 anos, embora todas as idades possam ser afetadas. A taxa de progressão da fase crônica para a crise blástica é de aproximadamente 5% a 10% durante os primeiros 2 anos e então de 20% a cada ano subseqüente. Como a crise blástica é rapidamente fatal, a morte é paralela à progressão para a crise blástica

Tratamento

O transplante alogênico de medula óssea (BMT) é a única terapia curativa conhecida. O sucesso do BMT depende do estágio da CML, da idade e da saúde do paciente, do doador de medula óssea (parente *versus* não-parente), do regime de preparação, do desenvolvimento de doença enxerto *versus* hospedeiro e do tratamento pós-transplante. Grande parte do sucesso a longo prazo do BMT depende do efeito enxerto *versus* leucemia, isto é, uma resposta enxerto *versus* hospedeiro dirigida contra as células leucêmicas. Após o BMT, os pacientes são freqüentemente monitorados quanto às recaídas e, se necessário, tratados.

Infelizmente, apenas 30% dos pacientes têm um doador parente ou não-parente HLA compatível. Os pacientes inelegíveis para BMT em geral são tratados com interferon-α, pois ele pode induzir remissões hematológicas e citogenéticas em alguns pacientes com CML da fase crônica. A durabilidade destas remissões não foi totalmente definida. O mecanismo de ação do interferon na CML é pouco compreendido, mas possivelmente é mediado pelo sistema imune. Como na leucemia aguda, os pacientes na crise blástica em geral são tratados com agentes citotóxicos e, se possível, BMT. Infelizmente, os resultados destas terapias são pobres.

Risco de Herança

Como a CML surge de uma mutação somática que não é encontrada na linhagem germinativa, o risco de um paciente passar a doença para sua prole é zero.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. O que é a hipótese de múltiplos eventos? Como isto se aplica à neoplasia?
2. Discuta dois mecanismos adicionais de ativação de proto-oncogenes no câncer humano, por exemplo, n-*myc* no neuroblastoma e os oncogenes *ras* nos carcinomas.
3. A neoplasia ilustra graficamente os efeitos do acúmulo de mutações somáticas. Entretanto, surgem outras doenças menos acentuadas, pelo menos em parte, pelo acúmulo de mutações somáticas. Discuta o efeito das mutações somáticas no envelhecimento.
4. Muitas mutações somáticas e muitos rearranjos citogenéticos nunca são detectados porque as células que os contêm não têm vantagem seletiva. Que vantagem confere o cromossomo Philadelphia?

Referências

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 341:164–172.

Polipose Adenomatosa Familiar

(Mutação APC)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Gene supressor tumoral
- Carcinogênese em várias etapas
- Mutação somática
- Instabilidade citogenética
- Expressividade variável

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: adolescência à vida adulta média
- Pólipos adenomatosos colorretais
- Câncer colorretal
- Cânceres primários múltiplos

História e Achados Físicos

R P , um homem de 35 anos de idade, foi encaminhado a uma clínica de genética do câncer por seu oncologista. Ele havia sofrido uma colectomia total. A mucosa colônica tinha mais de 2 000 pólipos e uma patologia compatível com a polipose adenomatosa do cólon. Além destas cicatrizes abdominais e da colostomia, ele tinha anomalias de pigmento retinal compatíveis com a hipertrofia congênita do epitélio pigmentar retinal. Vários de seus parentes haviam morrido de câncer. Ele não tinha uma história médica ou familiar de outros problemas de saúde. Com base na história médica e na história familiar sugestiva, o geneticista informou a R.P. que era mais provável que ele tivesse polipose adenomatosa familiar (FAP). O geneticista explicou o protocolo de vigilância para os filhos de R P e a possibilidade de usar testes moleculares para identificar as crianças com risco de FAP. Como R.P. não tinha contato com sua família, a análise de ligação não foi possível, e R.P. optou por continuar com a triagem do gene de polipose adenomatose do cólon (*APC*). Ele tinha uma mutação sem sentido no éxon 15 de um alelo APC

Bases

Etiologia da Doença

Pelo menos 50% das pessoas das populações ocidentais desenvolvem um tumor colorretal por volta dos 70 anos e cerca de 10% destes indivíduos eventualmente desenvolvem carcinoma colorretal. Cerca de 15% do câncer colorretal é familiar, incluindo a FAP e o câncer colorretal não-polipose hereditário (HNPCC). A FAP é uma síndrome de predisposição ao câncer autossômica dominante causada por mutações no gene *APC*. Tem uma prevalência de 2 a 3 por 100 000 e contribui com menos de 1% do câncer de cólon. As mutações *APC* também ocorrem em mais de 80% dos tumores colorretais esporádicos (ver Cap. 16).

Patogenia

O Apc direta ou indiretamente regula a transcrição, a adesão celular, os microtúbulos do citoesqueleto, a migração celular, a fissão críptica, a apoptose e a proliferação celular. Forma complexos com várias proteínas diferentes, incluindo a β-catenina

Tanto em seres humanos quanto em camundongos, ambos os alelos de *APC* devem ser inativados para a formação do adenoma. A alta freqüência de perda somática de função no segundo alelo de *APC* define a FAP como uma condição autossômica dominante. Esta perda somática de função ocorre por perda de heterozigose, mutação intragênica, inativação transcricional e, raramente, por efeitos negativos dominantes do alelo mutante herdado. Mais de 95% das mutações intragênicas em *APC* geram uma proteína APC truncada. A perda de APC funcional em geral resulta em altos níveis de β-catenina citosólica livre. A β-catenina livre migra para o núcleo, liga-se ao fator 4 de célula T e ativa inapropriadamente a expressão gênica. Compatível com este mecanismo, as mutações do gene de β-catenina foram identificadas em alguns carcinomas colorretais sem mutações em *APC*.

Embora a perda APC funcional faça com que as células afetadas formem grupos displásicos de células dentro das criptas intestinais, estas células não são cancerosas e devem sofrer outras mutações somáticas para progredir para o câncer (ver Cap. 16). Esta progressão é caracterizada por instabilidade citogenética na perda de grandes segmentos cromossômicos e, conseqüentemente, perda de heterozigose. As alterações genéticas específicas implicadas nesta progressão incluem a ativação de oncogenes Ki-*ras* ou N-*ras*, a inativação de um gene supressor tumoral em 18q, a inativação do gene *TP53* e alterações na metilação, levando ao silenciamento transcricional dos genes supressores tumorais. À medida que as células acumulam mutações, elas se tornam crescentemente neoplásicas e eventualmente formam carcinomas invasivos e metastáticos.

Fenótipo e História Natural

A FAP é caracterizada por centenas a milhares de pólipos adenomatosos colônicos (Fig. C.20). Ela é diagnosticada clinicamente seja pela presença de mais de 100 pólipos adenomatosos colorretais seja pela presença de 10 a 100 pólipos em um indivíduo com um genitor com FAP. Os pólipos adenomatosos em geral aparecem entre os 7 e os 40 anos de idade e aumentam rapidamente em número. Sem tratamento, 7% dos pacientes desenvolvem câncer colorretal aos 21 anos, 87% aos 45 anos e 93% aos 50 anos.

Embora a não-penetrância seja muito rara, os pacientes com mutações em linhagens germinativas de *APC* não desenvolvem necessariamente adenomas ou câncer colorretal. Eles apenas são predispostos. A etapa limitante na formação do adenoma é a mutação somática do alelo tipo selvagem de *APC*. A progressão de um adenoma para um carcinoma requer o acúmulo de outras alterações genéticas. Os pacientes com FAP correm um risco muito maior que a população geral de desenvolver carcinoma colorretal por dois motivos. Primeiro, embora o tempo médio para o progresso de um adenoma para um carcinoma seja de cerca de 23 anos, estes pacientes desenvolvem adenomas cedo na vida e têm menos probabilidade de morrer de outras causas antes do desenvolvimento do carcinoma. Segundo, embora menos de 1% dos adenomas progrida para carcinoma, os pacientes têm de dezenas a centenas de adenomas, cada um com o potencial de se transformar em carcinoma.

A penetrância e a expressividade das mutações em *APC* dependem da mutação particular de *APC*, do fundo genético e do ambiente. Mutações em diferentes regiões do gene estão variadamente associadas à síndrome de Gardner (uma associação de polipose adenomatosa colônica, osteomas e tumores de tecidos moles), à hipertrofia congênita do epitélio pigmentar retinal ou à polipose adenomatosa do cólon atenuada. Entre linhagens de camundongos com mutação *APC*, os alelos de uma fosfolipase A2 secretada modificam o número de adenomas. Modificadores similares podem fazer com que os pacientes com mutações germinativas idênticas tenham características clínicas diferentes. Muitos estudos de tumorigênese colorretal esporádica identificam um risco aumentado para pessoas que consomem dietas ricas em gordura animal. Portanto, considerando o mecanismo comum de tumorigênese, provavelmente a dieta também tem um papel na FAP

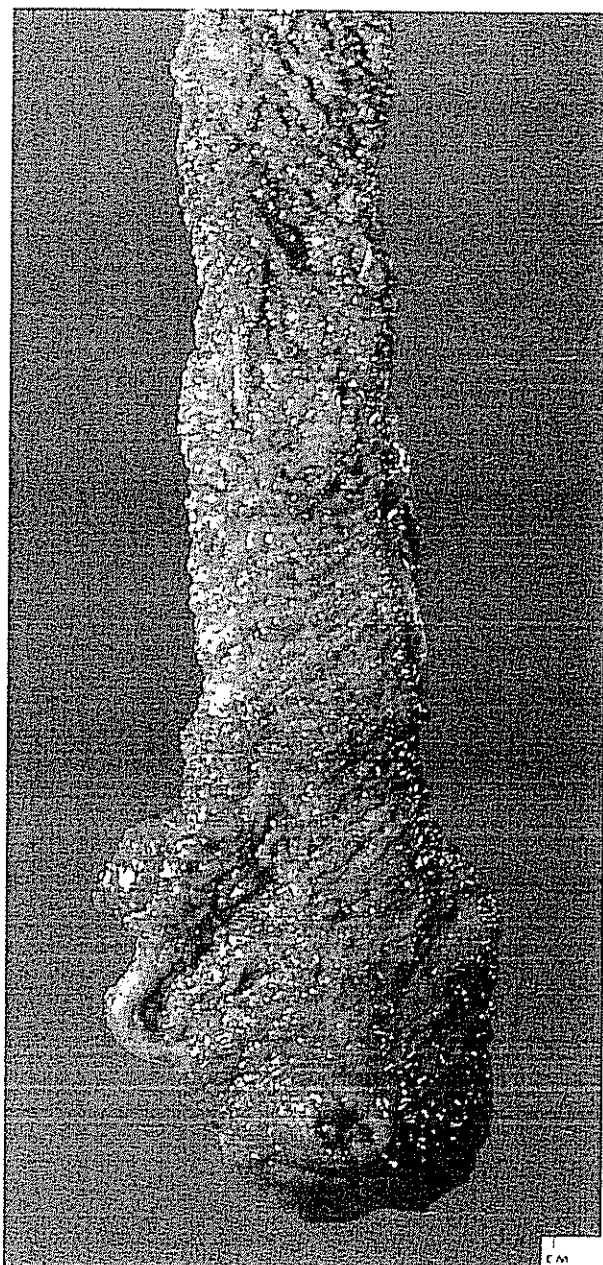



Fig. C.20 Foto da mucosa do cólon ascendente retirado de um paciente com polipose adenomatosa familiar. Notar o enorme número de pólipos. (Cortesia de J. Rutledge, University of Washington e Children's Hospital and Medical Center, Seattle.)

Tratamento

O reconhecimento da FAP é necessário para a intervenção efetiva, isto é, a prevenção do câncer colorretal. Após o desenvolvimento dos pólipos, o tratamento definitivo é a colectomia total com passagem íleo-anal. A vigilância recomendada para pacientes em risco de FAP é a sigmoidoscopia a cada 1 a 2 anos, começando com a idade de 10 a 12 anos. Para enfocar esta vigilância, o teste molecular é recomendado para identificar os membros familiares em risco.

Risco de Recorrência

O risco empírico durante a vida para câncer colorretal entre as populações ocidentais é de 5% a 6%. O risco é acentuadamente modificado pela história familiar. Os pacientes que têm um irmão com pólipos adenomatosos, mas não têm história familiar de câncer colorretal, têm um risco relativo de 1,78. O risco relativo aumenta para 2,59 se um irmão tiver desenvolvido adenomas antes dos 60 anos. Os pacientes com um parente em primeiro grau com câncer colorretal têm um risco relativo de 1,72. Este risco relativo aumenta para 2,75 se dois ou mais parentes em primeiro grau tiverem câncer colorretal. Se um parente afetado em primeiro grau tiver desenvolvido câncer colorretal antes dos 44 anos de idade, o risco relativo aumentará para mais de 5.

Em contraste, um paciente com FAP ou uma mutação germinativa de *APC* tem um risco de 50% de ter um filho afetado com FAP em cada gestação. A ausência de uma história familiar de FAP não impede o diagnóstico de FAP em um genitor porque cerca de 20% a 30% dos pacientes têm uma nova mutação germinativa em *APC*. O diagnóstico pré-natal está disponível usando análise de ligação ou testando a mutação se tiver sido definida a mutação no genitor. Devido à variação intrafamiliar na expressividade, a gravidade, a época de início e as características associadas infelizmente não podem ser previstas.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Cite distúrbios adicionais que demonstrem herança autossômica dominante, mas que são recessivos no nível celular. Por que estas heranças exibem herança autossômica dominante se são necessárias duas mutações para a expressão da doença? O que a observação de que duas mutações são necessárias para a expressão da doença sugere sobre a prevenção da doença?

2. Discuta alguns outros distúrbios genéticos raros que serviram de modelo ou esclareceram doenças mais comuns, incluindo pelo menos um para câncer e um para demência.

3. O que a associação da polipose adenomatosa do cólon atenuada com o dano precoce de Apc sugere sobre a base bioquímica da polipose adenomatosa do cólon atenuada comparada com a FAP clássica?

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Retinoblastoma

(Mutação RBI)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Gene supressor tumoral
- Hipótese de dois eventos
- Mutação somática
- Predisposição a tumor
- Regulação do ciclo celular
- Expressividade variável

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância
- Leucocoria
- Estrabismo
- Deterioração visual
- Conjuntivite

História e Achados Físicos

B B , um menino de 2 anos, foi encaminhado por seu pediatra para avaliação de estrabismo direito e leucocoria, um reflexo de uma massa branca no olho que dá um aspecto de pupila branca (para um exemplo, ver a Fig 16 7) Sua mãe relatou que ele havia desenvolvido esotropia direita progressiva durante o mês anterior à visita ao pediatra Não havia queixa de dor, tumefação ou vermelhidão no olho direito Sob outros aspectos, B B era saudável Ele tinha genitores saudáveis e uma irmã de 4 meses. Nenhum outro membro da família havia tido doença ocular Exceto pela leucocoria e pelo estrabismo, os achados de seu exame físico eram normais Seu exame oftalmológico definiu um tumor retinal único com diâmetro de disco 8 surgindo próximo à mácula A imagem de ressonância magnética da cabeça não mostrou extensão do tumor para fora do globo Ele recebeu quimioterapia combinada com irradiação focal (braquiterapia) A análise de DNA mostrou que ele tinha uma mutação de linhagem germinativa (transição de C para T) em um alelo de seu gene de retinoblastoma (*RB1*)

Bases

Etiologia da Doença

O retinoblastoma é uma neoplasia embrionária rara de origem retiniana (Fig C 21), que resulta de mutações somáticas ou na linhagem germinativa, ou ambas, em ambos os alelos de *RB1* Ela ocorre em todas as raças com uma incidência de 1 em 18 000 a 30 000

Patogenia

A proteína do retinoblastoma (Rb) é um supressor tumoral que tem um papel importante na regulação da progressão de células proliferativas ao longo do ciclo celular e da saída de células diferenciadas do ciclo celular A Rb efetua estas duas funções seqüestrando outros fatores de transcrição e promovendo a desacetilação de histonas, uma modificação da cromatina associada ao silenciamento gênico

As mutações *RB1* associadas ao retinoblastoma ocorrem na região codificante e promotor do gene. As mutações dentro da região codificante do gene ou desestabilizam a Rb ou comprometem sua associação com as enzimas necessárias para a desacetilação de histonas As mutações dentro da região do promotor reduzem a expressão de Rb normal. Ambos os tipos de mutações resultam em uma perda de Rb funcional

Quarenta por cento dos pacientes com retinoblastoma têm uma mutação germinativa *RB1*, mas apenas 10% de todos os pacientes têm uma história de outros membros familiares afetados. As mutações *RB1* incluem anomalias citogenéticas de 13q14, substituições de uma só base e pequenas inserções ou deleções. Algumas evidências sugerem que a maioria das novas mutações germinativas surge no alelo paterno, enquanto as mutações somáticas surgem com igual freqüência nos alelos materno e paterno Quase metade das mutações ocorre em dinucleotídeos CpG. Após a herança de um alelo mutante ou a geração de uma mutação somática em um alelo, o outro alelo *RB1* também deve perder a função para que uma célula prolifere sem controle e se desenvolva em um retinoblastoma (ver Cap. 16). A perda de um segundo alelo funcional acontece pela ocorrência de uma nova mutação, perda de heterozigose ou hipermetilação de ilhas de CpG do promotor. A deleção ou o desenvolvimento da isodissomia ocorre com mais freqüência, e a hipermetilação do promotor ocorre com menos freqüência

O retinoblastoma em geral se segrega como um distúrbio autossômico dominante com penetrância total. Algumas famílias foram descritas com penetrância reduzida As mutações *RB1* identificadas nestas famílias incluem mutações de sentido trocado, deleções *in-frame* e mutações em promotor. Em contraste com os alelos *RB1* nulos mais comuns, estas mutações são tidas como representando alelos com alguma função residual.

Fenótipo e História Natural

Os pacientes com retinoblastoma bilateral em geral o apresentam durante o primeiro ano de vida, enquanto aqueles com a doença unilateral a apresentam um pouco mais tarde, com um pico entre 24 e 30 meses. Setenta por cento dos pacientes têm retinoblastoma unilateral e 30% têm retinoblastoma bilateral. Todos os pacientes com doença bilateral têm mutações *RB1* na linhagem germinativa, mas nem todos os pacientes com mutações germinativas desenvolvem doença bilateral Em cerca de 80% a 95% dos pacientes a doença é diagnosticada antes dos 5 anos A

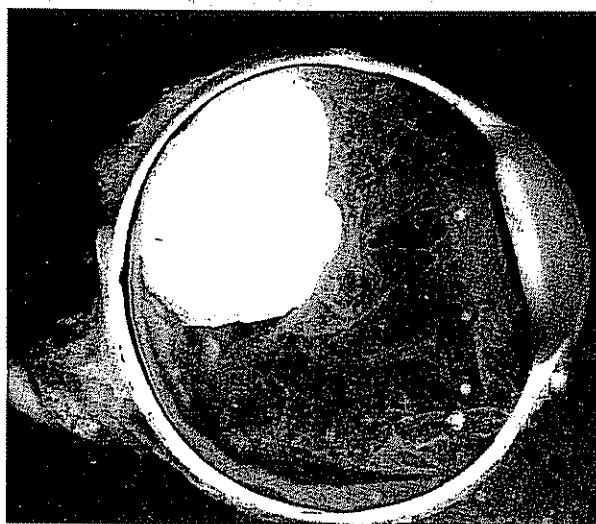



Fig. C.21 Corte na linha média de um olho enucleado de um paciente com retinoblastoma Notar o grande tumor primário no terço posterior do globo e alguns pontos vítreos brancos (A descoloração marrom do vítreo é um artifício de coloração) (Cortesia de R A Lewis. Baylor College of Medicine. Houston)

doença é quase uniformemente fatal se não for tratada, mas com a terapia apropriada mais de 80% a 90% dos pacientes estão livres da doença 5 anos após o diagnóstico.

Como se poderia esperar, no que diz respeito às mutações de um importante regulador do ciclo celular, os pacientes com mutações germinativas *RB1* têm um acentuado aumento de risco de neoplasias secundárias, risco este que é aumentado por fatores ambientais, como o tratamento do retinoblastoma inicial com radioterapia. Os neoplasmas secundários mais comuns são osteossarcomas, sarcomas de tecido mole e melanomas. Não há aumento nas malignidades secundárias em pacientes com retinoblastoma não-hereditário.

Tratamento

A detecção bem inicial e o tratamento são essenciais para um resultado ótimo. As metas da terapia são curar a doença e preservar o que for possível da visão. O tratamento é ajustado de acordo com o tamanho do tumor e o envolvimento de tecidos adjacentes. As opções de tratamento para o retinoblastoma intra-ocular incluem a enucleação, vários modos de radioterapia, crioterapia, coagulação com luz e quimioterapia.

Se a doença for unilateral na época da apresentação do paciente, ele precisará de exames freqüentes quanto ao desenvolvimento de novos retinoblastomas no olho não-afetado, pois 30% dos casos aparentemente esporádicos são causados pela herança de uma nova mutação na linhagem germinativa. Tais exames freqüentes em geral são continuados até pelo menos os 7 anos de idade.

Para um acompanhamento mais eficiente, os pacientes devem receber testes moleculares para identificar as mutações no gene *RB1*. O ideal é que primeiro seja testada uma amostra do tumor e depois outro tecido do paciente, tal como sangue, seja examinado para se determinar se uma destas mutações é germinativa. Se não for germinativa, então o paciente não precisará de um acompanhamento tão freqüente.

Risco de Herança

Se um paciente teve retinoblastoma bilateral e, por consequinte, provavelmente tem uma mutação germinativa, o risco empírico de um filho afetado é de 45%. Isto reflete a alta probabilidade de uma segunda mutação somática (ou "evento") ter ocorrido no segundo alelo *RB1* da criança. Por outro lado, se o genitor teve a doença unilateral, o risco empírico de uma criança ser afetada é de 7% a 15%. Isto reflete a proporção relativa das mutações germinativas *versus* as mutações somáticas nos pacientes com a doença unilateral. Noventa por cento das crianças que desenvolvem retinoblastoma surgem como o primeiro membro a ser afetado na família. Aproximadamente 1% dos pacientes sem uma história clínica de retinoblastoma têm evidência de um retinoblastoma espontaneamente resolvido ao exame da retina. Assim, para estas famílias, o risco de uma criança afetada é de 45%. Exceto para a situação rara na qual um genitor é um portador não-penetrante de uma mutação *RB1*, as famílias nas quais nenhum dos genitores tem retinoblastoma têm um risco de recorrência equivalente ao da população geral (1 em 18.000 a 30.000).

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Que outras doenças se desenvolvem como resultado de uma alta freqüência de mutações em dinucleotídeos CpG? Qual o mecanismo da mutação em dinucleotídeos CpG? O que pode explicar a freqüência aumentada de mutações em dinucleotídeos CpG com o aumento da idade paterna?
2. Compare e contraste o tipo e a freqüência dos tumores observados na síndrome de Li-Fraumeni com aqueles observados no retinoblastoma. Tanto Rb quanto o p53 são supressores tumorais. Por que as mutações *TP53* estão associadas a um fenótipo diferente das mutações *RB1*?
3. Discuta quatro doenças que surgem como resultado de mutações somáticas. Os exemplos devem ilustrar recombinação cromossômica, perda de heterozigose, amplificação gênica e acúmulo de mutações de ponto.
4. Tanto Sry (ver Cap. 10) quanto Rb regulam o desenvolvimento modulando a expressão gênica pela modificação da estrutura da cromatina. Compare e contraste os dois mecanismos diferentes que cada um usa para modificar a estrutura da cromatina.

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Reversão Sexual

(Mutação ou Translocação de SRY)

Ligada ao Y ou Cromossômica

Fundamentos

- Reversão sexual
- Gene regulador do desenvolvimento
- Recombinação ilegítima
- Penetrância incompleta
- Loci de fertilidade

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: pré-natal
- Esterilidade
- Características sexuais secundárias reduzidas
- Genitália não-ambígua

História e Achados Físicos

Ms R., uma executiva de 37 anos de idade, estava grávida de seu primeiro filho Em função de seu risco relacionado à idade de ter um filho com uma anomalia cromossômica, ela optou por fazer uma amniocentese para avaliar o cariótipo fetal. O resultado do cariótipo foi normal 46,XX. Na 18.ª semana de gestação, um ultra-som fetal revelou um feto masculino normal Um ultra-som detalhado subseqüente confirmou um feto masculino Ms. R. teve boa saúde antes e durante a gravidez. Ela não teve nenhuma exposição durante a gestação. Nem ela nem seu marido tinham uma história familiar de genitália ambígua, esterilidade ou anomalias congênitas A reavaliação da análise cromossômica confirmou um cariótipo normal 46,XX, mas a hibridização *in situ* com fluorescência identificou um sinal de região determinante do sexo de gene no Y (*SRY*) em um cromossomo X (Fig C.22). Com 38 semanas de gestação, Ms R teve um parto normal espontâneo de uma criança fenotipicamente normal e masculina

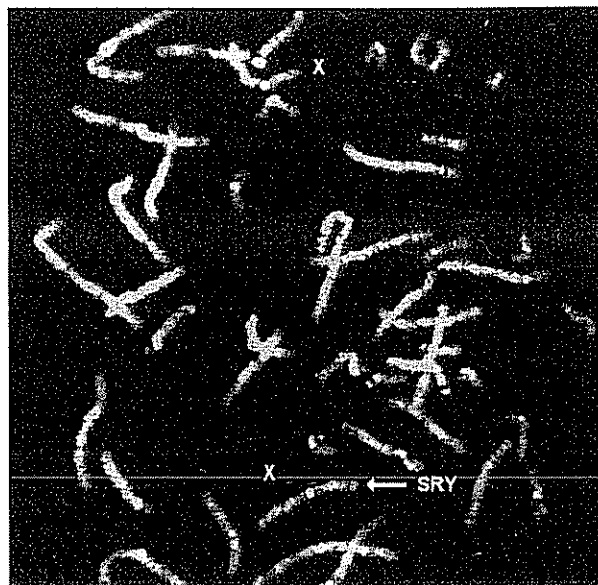



Fig. C.22 Hibridização *in situ* com fluorescência de uma sonda específica de locus em cromossomo metafásico para detecção da t(X;Y)(p22 3;p11 2) em um homem XX *SRY*⁺ Os cromossomos são contracorados com DAPI A sonda para *SRY* é uma mistura de seqüências específicas de locus (*vermelho*) O centrômero do cromossomo X é sondado com seqüências que estão mapeadas no DNA satélite alfa (*verde*) Nas células normais, o sinal vermelho é observado apenas no cromossomo Y. Nas células com t(X;Y)(p22 3;p11 2) um sinal vermelho é observado no cromossomo X anormal e um sinal verde é observado em ambos os cromossomos X (Cortesia de B Bejjani e L Shaffer. Baylor College of Medicine. Houston)

Bases

Etiologia da Doença

A reversão do sexo é pan-étnica e geneticamente heterogênea. Nos pacientes com disgenesia gonadal completa, as mutações de ponto, deleções ou translocações de *SRY* são a causa mais comum de reversão do sexo (ver Cap 10) Aproximadamente 80% dos homens 46,XX com disgenesia gonadal completa têm uma translocação de *SRY* para um cromossomo X, e de 20% a 30% das mulheres 46,XY com disgenesia gonadal completa têm uma mutação ou deleção envolvendo *SRY* A incidência de homens 46,XX e de mulheres 46,XY é de cerca de 1 em 20.000

Patogenia

Sry é uma proteína de ligação ao DNA que altera a estrutura da cromatina e o dobramento do DNA. Estas propriedades de ligação e dobramento do DNA sugerem que a Sry regula a expressão gênica

Durante o desenvolvimento humano normal, Sry é necessária para a formação da genitália masculina, e sua ausência é permissiva para a formação da genitália feminina O mecanismo exato pelo qual Sry efetua o desenvolvimento da genitália masculina é indefinido, embora algumas observações sugiram que Sry reprime um regulador negativo do desenvolvimento testicular

As mutações *SRY* identificadas em mulheres XY causam uma perda da função de Sry De 10% a 15% das mulheres XY têm uma deleção de *SRY* (mulheres XY *SRY*⁻) e de 10% a 15% têm mutações de ponto dentro de *SRY* As mutações de ponto dentro de *SRY* prejudicam ou a ligação ou o dobramento do DNA

A alteração *SRY* observada em homens XX é uma translocação de *SRY* de Yp para Xp (homens XX *SRY*⁺; ver Fig C.22). Durante a meiose masculina, um crossing over obrigatório ocorre entre as regiões pseudo-autossômicas de Xp e Yp Este crossing garante a segregação apropriada dos cromossomos e mantém a identidade da seqüência entre as regiões pseudo-autossômicas do X e do Y. Ocasionalmente, entretanto, ocorrem recombinações centroméricas para a região pseudo-autossômica, o que resulta na transferência de seqüências específicas de Yp, incluindo *SRY*, para Xp (ver Cap. 10)

Além de *SRY*, o cromossomo Y contém pelo menos três loci (loci de fatores azoospérmicos AZFa, AZFb e AZFc) necessários para o desenvolvimento normal dos espermatozóides. A ausência destes loci pelo menos parcialmente explica a infertilidade dos homens XX *SRY*⁺.

O cromossomo X também contém vários loci necessários para a manutenção ovariana e a fertilidade feminina. O desenvolvimento do ovócito requer um único cromossomo X, mas a manutenção destes ovócitos requer dois cromossomos X. Compatível com estas observações, os fetos femininos XY desenvolvem ovócitos, mas seus folículos ovarianos degeneram ao nascimento ou logo após. A ausência de um segundo cromossomo X explica, portanto, a infertilidade das fêmeas XY

Fenótipo e História Natural

Os homens XX *SRY*⁺ têm muitas características da síndrome de Klinefelter (47,XXY), incluindo hipogonadismo, azoospermia, hialinização dos túbulos seminíferos e ginecomastia A despeito da produção diminuída de testosterona, a maioria dos pacientes entra espontaneamente na puberdade, embora possa precisar de suplementação de testosterona para atingir a virilização total. Em contraste com os pacientes com síndrome de Klinefelter, a maioria dos pacientes masculinos 46,XX tem estatura normal ou baixa, proporções esqueléticas normais, inteligência normal e menos problemas psicossociais. Os pacientes com uma grande parte de Yp em um cromossomo X assemelham-se mais aos pacientes com síndrome de Klinefelter.

As mulheres XY *SRY*⁻ têm uma disgenesia gonadal completa e em geral são mais altas que a média das mulheres normais Estes pacientes têm características físicas da síndrome de Turner apenas quando a deleção de *SRY* está associada a uma ampla deleção de Yp. Como estes pacientes têm apenas gônadas em fibra, não entram espontaneamente na puberdade.

Em contraste com a penetrância completa e a expressividade relativamente uniforme observadas na translocação ou deleção de *SRY*, as mutações de ponto de *SRY* exibem tanto penetrância incompleta quanto expressividade variável. Em geral os pacientes com mutações de ponto *SRY* têm disgenesia gonadal completa, são mais altos que as mulheres normais e não desenvolvem espontaneamente características sexuais secundárias. Algumas mutações de ponto *SRY*, entretanto, foram associadas a um fenótipo feminino infértil (disgenesia gonadal completa) e a um fenótipo masculino fértil dentro da mesma família

Tratamento

Nos pacientes com disgenesia gonadal completa, o diagnóstico de reversão sexual em geral surge devido à discordância entre o ultra-som fetal e o cariótipo fetal ou devido à ausência ou desenvolvimento sexual secundário incompleto e infertilidade. A confirmação de que a reversão sexual é secundária a uma anomalia de expressão de *SRY* requer a demonstração da alteração apropriada de *SRY*.

Para homens XX *SRY*⁺, a suplementação de andrógeno em geral é efetiva para a virilização, mas o tratamento da azoospermia atualmente não é possível. A administração de andrógenos suplementares não evita a ginecomastia Os pacientes precisarão de tratamento cirúrgico, se a ginecomastia se tornar suficientemente embaraçosa ou grave.

Para as mulheres XY *SRY*⁻ e os homens XY com mutações de ponto de *SRY*, a terapia de estrogênio em geral é iniciada por volta dos 14 a 15 anos de idade para promover o desenvolvimento das características sexuais secundárias. A terapia de progesterona é adicionada ao regime para induzir menstruações ou na época do primeiro sangramento vaginal ou no segundo ano da terapia com estrogênio. Além disso, devido ao risco de desenvolvimento de gonadoblastoma, é recomendado que as gônadas disgênicas sejam removidas quando o crescimento esquelético estiver completo.

Como em todos os distúrbios de ambigüidade genital ou de discordância entre o sexo genético e o fenotípico, a conduta psicossocial e a informação à família e ao paciente são extremamente importantes Muitos pacientes e suas famílias têm dificuldade para compreender os dados médicos e fazer os ajustes psicossociais apropriados.

Risco de Herança

A recombinação ilegítima *de novo* é a causa mais comum de homens XX *SRY*⁺ e mulheres XY *SRY*⁻ Portanto, a maioria dos casais com um filho afetado tem um risco baixo de recorrência em futuros filhos Raramente, entretanto, homens XX *SRY*⁺ e mulheres XY *SRY*⁻ surgem como um resultado da herança de uma deleção *SRY* ou translocação de um pai com uma translocação balanceada entre Xp e Yp Se o pai for portador de uma translocação, todos os filhos serão ou meninos XX *SRY*⁺ ou meninas XY *SRY*⁻ Como os homens XX *SRY*⁺ e as mulheres XY *SRY*⁻ são invariavelmente estéreis, eles não correm risco de transmitir o distúrbio

A maioria das mulheres XY com mutações de ponto em *SRY* têm mutações *de novo*. Os genitores de uma criança afetada, portanto, em geral têm um risco baixo de recorrência em futuros filhos. Entretanto, como algumas mutações *SRY* têm penetrância incompleta, pais férteis normais podem ter mutações *SRY* que podem ou não causar reversão sexual entre seus filhos XY.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1 Mutações de outros genes, tais como *WT1*, *SOX9*, *SF-1* e *DAX-1*, também podem resultar em reversão sexual. Compare e contraste os fenótipos observados nestas mutações com os observados nas mutações *SRY*.

2. A associação de mutações de ponto *SRY* com um fenótipo feminino infértil e um fenótipo masculino fértil dentro da mesma família sugerem ou uma variação estocástica dependente da atividade reduzida de Sry ou uma segregação de outro locus que interage com *SRY* Por quê? Como isto pode ser resolvido?

3 As mutações que afetam a síntese de esteróides ou a resposta a esteróides em geral estão associadas à genitália ambígua, enquanto as mutações *SRY* em geral estão associadas à genitália revertida, mas não ambígua. Discuta os motivos desta generalização.

4. Discuta o sexo genético, gonadal, fenotípico e psicológico, e a importância de cada um na informação genética.

Referências

Grumbach MM, Conte FA (1998) Disorders of sex differentiation *In* Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds) Williams Textbook of Endocrinology, 9th ed WB Saunders, Philadelphia, pp. 1303-1425.

Síndrome de Marfan

(Mutação FBN1)

Autossômica Dominante

Fundamentos

- Mutações dominantes negativas
- Expressividade variável
- Genocópia

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: começo da infância
- Altura desproporcionalmente grande
- Anomalias esqueléticas
- Ectopia *lentis*
- Prolapso de valva mitral
- Dilatação e ruptura aórtica
- Pneumotórax espontâneo
- Ectasia lombossacral

História e Achados Físicos

J.L., uma saudável estudante e astro de basquete de 16 anos de idade, foi encaminhada a uma clínica de genética para avaliação de síndrome de Marfan. Seu físico era similar ao de seu pai. Seu pai, um homem alto, havia morrido durante uma manhã (enquanto fazia *cooper*). Nenhum outro familiar tinha uma história de anomalias esqueléticas, morte súbita, perda de visão ou anomalias congênitas. Ao exame físico, J.L. tinha um aspecto astênico com palato ogival alto, *pectus carinatum* leve, aracnodactilia, uma proporção da amplitude dos braços em relação à altura de 1:1, um sopro diastólico e marcas em seus ombros e coxas. Ela foi encaminhada para uma ecocardiografia, que mostrou uma dilatação na aorta ascendente com regurgitação aórtica. Um exame oftalmológico mostrou uma iridodonese bilateral e um leve deslocamento do cristalino para cima. Com base em seu exame físico e nos resultados do teste, o geneticista explicou a J.L. que ela tinha síndrome de Marfan. J.L. casou-se e adotou uma criança, decidindo não engravidar.

Bases

Etiologia da Doença

A síndrome de Marfan é um distúrbio pan-étnico autossômico dominante do tecido conjuntivo que resulta de mutações no gene de fibrilina-1 (*FBN1*). A síndrome de Marfan tem uma incidência de 1 em 10.000 a 1 em 20.000. Cerca de 25% a 35% dos pacientes têm mutações *de novo*.

Patogenia

O *FBN1* codifica a fibrilina-1, uma glicoproteína extracelular com distribuição ubíqua. A fibrilina-1 polimeriza-se para formar microfibrilas, moléculas estruturais em tecidos de sobrecarga, tais como a adventícia aórtica, zônulas ciliares e pele.

As mutações que levam à síndrome de Marfan são dispersas ao longo do gene, e cada mutação em geral é única para uma família. Estas mutações afetam a síntese de fibrilina-1, o processamento, a secreção, a polimerização ou a estabilidade. Os estudos da deposição de fibrilina-1 e a dosagem de expressão em culturas celulares em geral sugerem uma patogenia dominante negativa, isto é, a produção de fibrilina-1 mutante inibe a formação de microfibrilas normais pela fibrilina-1 normal ou estimula a proteólise imprópria de microfibrilas extracelulares.

Além da síndrome de Marfan, as mutações em *FBN1* causam uma síndrome neonatal de Marfan, aracnodactilia familiar, ectopia *lentis* autossômica dominante, fenótipo MASS (sinais marfanóides envolvendo a valva mitral, a aorta, o esqueleto e a pele) e características ósseas marfanóides isoladas. Em geral, os fenótipos são mais ou menos consistentes dentro de uma família, embora a gravidade do fenótipo possa variar bastante. Ocasionalmente, entretanto, uma mutação *FBN1* dentro de uma família causa mais de um destes fenótipos. Até esta data, não surgiram correlações genótipo-fenótipo claras. A variabilidade intra- e interfamiliar sugere que fatores ambientais e epigenéticos têm um papel significativo na determinação do fenótipo.

Fenótipo e História Natural

A síndrome de Marfan é um distúrbio multissistêmico, com anomalias esqueléticas, oculares, cardiovasculares, pulmonares, da pele e durais. As anomalias esqueléticas incluem estatura desproporcionalmente alta (relação da amplitude dos braços:altura > 1,05; normal < 1,05), aracnodactilia, deformidades do peito, escoliose, frouxidão das articulações e palato estreito. As anomalias oculares incluem ectopia *lentis* (Fig. C.23), córneas achatadas, aumento do globo e íris hipoplásicas. As anomalias cardiovasculares incluem prolapso de valva mitral, regurgitação aórtica e dilatação e dissecção da aorta ascendente. As anomalias pulmonares incluem pneumotórax espontâneo e vesículas apicais. As anomalias de pele incluem estrias atróficas e hérnia recorrente. As anomalias durais incluem ectasia lombossacral.

Muitas características da síndrome de Marfan desenvolvem-se com a idade. As anomalias esqueléticas, tais como as deformidades do tórax anterior e a escoliose, pioram com o crescimento ósseo. A subluxação do cristalino tende a progredir durante o início da infância ou adolescência. Um glaucoma secundário em geral se desenvolve vários anos

Fig. C.23 Ectopia *lentis*. Visão da lâmpada de fenda do olho esquerdo de um paciente com síndrome de Marfan. O *asterisco* indica o centro do cristalino que está deslocado para o lado nasal superior. Normalmente ele está no centro da pupila. As setas indicam as margens do cristalino que são anormalmente visíveis na pupila. (Cortesia de A.V. Levin, The Hospital for Sick Children e University of Toronto.)

após a subluxação do cristalino e após o deslocamento do cristalino para a câmara anterior. As complicações cardiovasculares manifestam-se em qualquer idade e progridem durante a vida.

As principais causas de morte prematura dos pacientes com síndrome de Marfan são a insuficiência cardíaca por regurgitação aórtica e dissecção e rompimento aórtico. À medida que o tratamento cirúrgico e médico da dilatação da aorta melhoraram, entretanto, melhorou também a sobrevida. Entre 1972 e 1993, a idade até a qual se previa que 50% dos pacientes sobrevivessem subiu de 49 para 74 anos no caso das mulheres e de 41 para 70 anos no caso dos homens.

Tratamento

A síndrome de Marfan é um diagnóstico clínico definido pela presença de características particulares. A confirmação da síndrome de Marfan pela identificação de mutações em *FBN1* não é atualmente prática porque a extrema heterogeneidade alélica dificulta muito a identificação da mutação causadora em cada família e também por causa da falta de correlação genótipo-fenótipo confiável. Nas famílias que segregam a síndrome de Marfan, uma pessoa em risco pode ser identificada por análise de ligação se um marcador informativo se segregar com a doença.

Nenhum tratamento curativo está disponível para a síndrome de Marfan. Portanto, o tratamento enfoca a prevenção e o tratamento sintomático. O tratamento oftalmológico inclui exames freqüentes, correção da miopia e, em geral, a recolocação do cristalino. O tratamento ortopédico inclui suportes ou cirurgia para a escoliose, ou ambos, reconstrução da parede torácica para comprometimento pulmonar e terapia física e ortótica para instabilidade articular. O tratamento cardiovascular é uma combinação de terapias médica e cirúrgica. A terapia médica tenta evitar ou diminuir (ou ambos) a progressão da dilatação da aorta reduzindo a força de ejeção ventricular com bloqueadores beta-adrenérgicos e restringindo a participação em atividades estressantes e a exposição ao estresse emocional. A reposição profilática da aorta proximal e da raiz aórtica é recomendada quando a dilatação aórtica torna-se suficientemente grave.

As mudanças hemodinâmicas associadas à gravidez são particularmente difíceis de lidar. Embora a maioria das mulheres com síndrome de Marfan não tenha grandes complicações durante a gravidez e o parto, a maioria das dissecções aórticas em pacientes jovens ocorre em mulheres grávidas. As dissecções aórticas são tidas como secundárias às mudanças hormonais, de volume sanguíneo e débito cardíaco associadas à gravidez e ao parto.

Risco de Herança

Os pacientes com síndrome de Marfan têm um risco de 50% de ter um filho afetado pela síndrome. O diagnóstico pré-natal só está disponível para as famílias nas quais os estudos de linhagem são possíveis ou nas quais a mutação *FBN1* foi identificada.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. A homocistinúria foi há muito considerada uma genocópia da síndrome de Marfan. Por quê? Como estes dois distúrbios podem ser distintos pela história médica? Pelo exame físico? Por testes bioquímicos?
2. Discuta as diferenças entre um diagnóstico pré-natal feito por análise de ligação e um feito pela identificação de uma mutação "causadora de doença". Que fatores influenciam a precisão de cada diagnóstico? Como os resultados destes testes devem ser apresentados aos genitores?
3. O que são mutações dominantes negativas? O que são mutações de propriedades novas? Contraste as duas. Por que as mutações dominantes negativas são comuns nos distúrbios dos tecidos conjuntivos?
4. Se uma pessoa deseja criar um tratamento curativo para um distúrbio causado por mutações dominantes negativas, como deve ser a terapia em nível molecular? Como isto difere do tratamento de uma doença causada por mutações de perda de função?

Referências

Dietz HC, Pyeritz RE (2001) Marfan syndrome and related disorders. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp 5287–5311.

Síndrome de Miller-Dieker

(Deleção Hemizigota 17p13.3)

Cromossômica

Fundamentos

- Síndrome de microdeleção
- Distúrbio de genes contíguos
- Haploinsuficiência

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: pré-natal
- Lissencefalia tipo 1 ou 2
- Dismorfismo facial
- Deficiência mental global grave
- Convulsões
- Morte precoce

História e Achados Físicos

B.B., um menino de 5 dias nascido de 38 semanas de gestação, foi admitido na UTI neonatal devido a hipotonia acentuada e dificuldades de alimentação. Ele era o produto de uma gestação sem complicações. Um ultra-som na 14.ª semana de gestação e uma triagem tripla materna na 16.ª semana de gestação haviam sido normais. B.B. nasceu de parto vaginal (apresentação cefálica, espontânea). Seus valores de Apgar foram 8 no 1.º minuto e 9 aos 5 minutos. Ele não tinha uma história familiar de distúrbios genéticos, neurológicos ou congênitos. Ao exame físico, B.B. tinha hipotonia e características faciais levemente dismórficas, incluindo estreitamento bitemporal, ponte nasal baixa, nariz pequeno com narinas antevertidas e micrognatia. Sob outros aspectos, os achados dos exames foram normais. Sua avaliação incluiu eletrólitos normais do soro, uma triagem metabólica normal, estudos normais quanto a infecções congênitas e ultra-som cerebral anormal. O ultra-som havia mostrado um corpo caloso hipoplásico, leve dilatação ventricular e córtex liso. Em adição a estes estudos, a equipe de consultoria genética recomendou uma análise cromossômica, hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) para *LIS1* (17p13.3) e imagens de ressonância magnética (MRI) do cérebro. A MRI mostrou um córtex cerebral espessado, agiria cerebral completa, heterotopias cerebrais múltiplas, corpo caloso hipoplásico, cerebelo normal e tronco cerebral normal. A análise cromossômica era normal (46,XY), mas a FISH mostrou uma deleção de *LIS1* em um cromossomo 17. Com base nestes resultados, o geneticista explicou aos genitores que B.B. tinha síndrome de Miller-Dieker (MDS). Os genitores recusaram outras medidas além das necessárias para manter a criança confortável, e B.B. morreu com 2 meses de idade.

Bases

Etiologia da Doença

A MDS é uma síndrome de genes contíguos causada pela deleção hemizigota de 17p13.3. O mecanismo subjacente recorrente da deleção de 17p13.3 ainda não foi elucidado, mas pode (como outras síndromes de microdeleção; ver Cap. 10) envolver seqüências de DNA repetitivo. A MDS é um distúrbio raro, de incidência indefinida e que ocorre em todas as populações.

Patogenia

Mais de 50 genes foram mapeados dentro da região da deleção MDS em 17p13.3, mas apenas o gene *LIS1* foi associado a uma característica fenotípica específica de MDS. A hemizigose para *LIS1* causa lissencefalia. *LIS1* codifica a isoforma cerebral da subunidade β não-catalítica do fator de ativação plaquetária acetilidrolase (PAFAH). PAFAH hidrolisa o fator de ativação plaquetária, um inibidor da migração neuronal. PAFAH também se liga e estabiliza microtúbulos. As observações preliminares sugerem que PAFAH pode ter um papel na reorganização de microtúbulos necessária para a migração neuronal.

A haploinsuficiência de *LIS1* não causa as outras características dismórficas associadas à MDS. As mutações de ponto ou deleções isoladas de *LIS1* causam uma seqüência isolada de lissencefalia (ILS), isto é, lissencefalia sem outros dismorfismos. Como todos os pacientes com MDS têm dismorfologia facial, este dismorfismo pode ser causado pela haploinsuficiência de gene(s) diferente(s) no intervalo comum de deleção da MDS.

Fenótipo e História Natural

As características de MDS incluem disgenesia cerebral, hipotonia, falta de desenvolvimento e dismorfismo facial. A disgenesia cerebral é caracterizada por lissencefalia tipo 1 (agiria completa) ou tipo 2 (ampla agiria com poucos sulcos nos pólos frontal ou occipital), um córtex cerebral com quatro camadas em vez de seis, heterotopias de substância cinzenta e substância branca atenuada. Alguns pacientes também têm má-formações cardíacas e onfaloceles.

Os pacientes com MDS alimentam-se e crescem pouco. Sorriso, breve fixação visual e respostas motoras inespecíficas são as únicas habilidades desenvolvimentais que a maioria dos pacientes adquire. Além da deficiência mental, os pacientes em geral sofrem opistótonos, espasticidade e convulsões. Quase todos os pacientes morrem aos 2 anos de idade.

Tratamento

As características faciais do paciente e um achado de MRI de lissencefalia em geral sugerem um diagnóstico de MDS (Fig. C.24). A confirmação do diagnóstico, entretanto, requer a detecção de uma deleção 17p13.3 por análise cromossômica ou FISH com uma sonda específica para *LIS1*. Aproximadamente 60% dos pacientes têm uma deleção visível da região crítica de MDS.

A MDS é incurável. Portanto, o tratamento enfoca os sintomas e os cuidados paliativos. Quase todos os pacientes precisam de tratamento farmacológico para as convulsões. Muitos pacientes também recebem alimentação por tubo nasogástrico ou gastrostomia por causa da alimentação pobre e da repetida aspiração.

Risco de Herança

Oitenta por cento dos pacientes têm uma microdeleção *de novo* de 17p13.3 e 20% herdam a deleção de um genitor que possui um rearranjo cromossômico balanceado. Devido à freqüência com a qual a deleção é herdada de um genitor com translocação balanceada, os cariótipos e FISH para *LIS1* devem ser verificados em ambos os genitores. Um genitor com uma translocação balanceada envolvendo 17p13.3 tem um risco de aproximadamente 26% de ter um filho nativivo anormal (MDS ou dup17p) e um risco de aproximadamente 22% de perda da gestação. Em contraste, se um paciente tem MDS como resultado da uma deleção *de novo*, os genitores têm um risco baixo de recorrência de MDS em filhos futuros.

Embora a má-formação cerebral de MDS resulte de uma migração incompleta de neurônios do córtex cerebral durante o terceiro e quarto meses de gestação, a lissencefalia não é detectada pela MRI fetal ou pelo

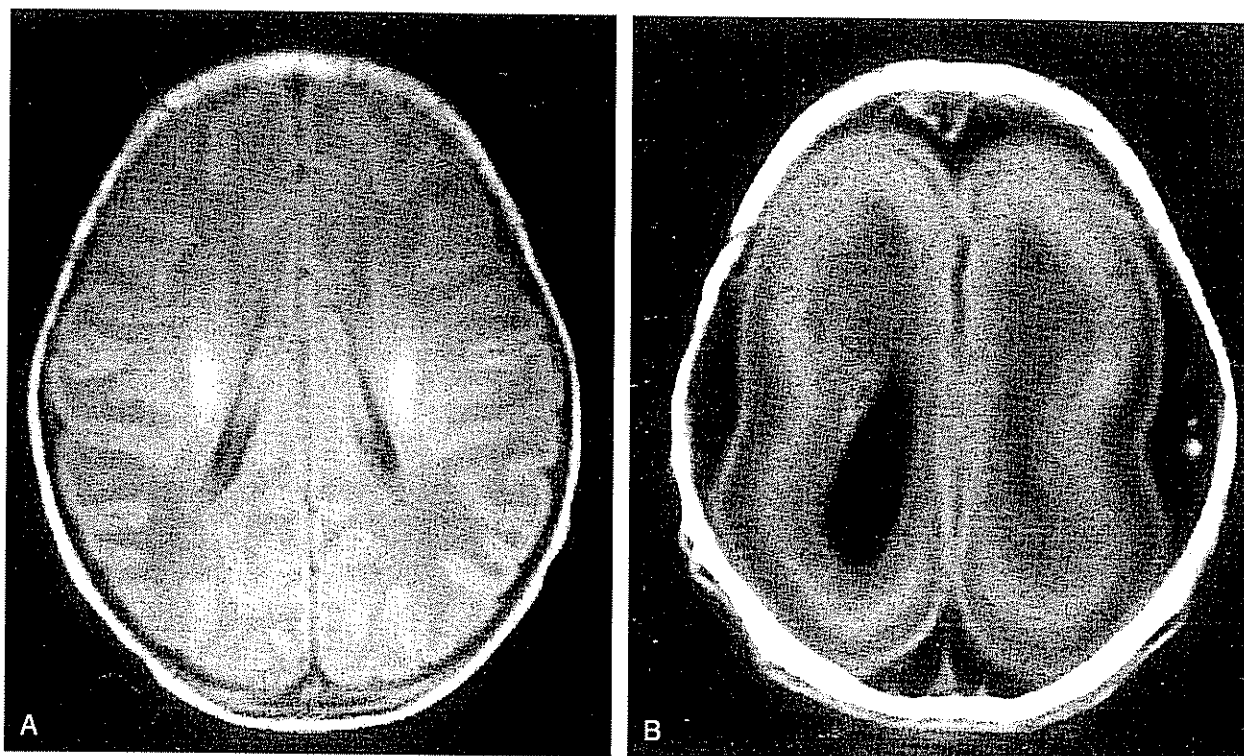



Fig. C.24 Imagens de ressonância magnética do cérebro de uma criança sem lissencefalia (*A*) e de uma criança com síndrome de Miller-Dieker (MDS) (*B*). Notar a superfície cerebral lisa, o córtex cerebral espesso e o clássico aspecto de "figura em 8" do cérebro do paciente com MDS. (Cortesia de D. Chitayat, The Hospital for Sick Children e University of Toronto.)

ultra-som até a gestação avançada. O diagnóstico pré-natal de MDS requer a detecção de uma deleção 17p13.3 nas vilosidades coriônicas ou amniócitos.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. A síndrome de Rubenstein-Taybi é causada seja por deleção de 16p13.3 seja por mutação da transcrição do fator *CREBBP*. Compare e contraste a relação de *CREBBP* e a síndrome de Rubenstein-Taybi com a relação de *LIS1* e MDS. Por que a MDS é uma síndrome de deleção de genes contíguos, enquanto a síndrome de Rubenstein-Taybi não?
2. As mutações de *LIS1* no cromossomo 17 ou *DCX* no cromossomo X contribuem com aproximadamente 75% da seqüência isolada de lissencefalia. Que características da história familiar e MRI cerebral podem ser usadas para enfocar os testes de *DCX* em oposição à *LIS1*?
3. Com 30 semanas de gestação, uma mulher fez um ultra-som fetal que mostrou lissencefalia fetal. Sob outros aspectos, a gestação não apresentava complicações, e os achados de um ultra-som fetal realizado mais cedo na gestação haviam sido normais. Que informação e avaliação são indicadas? Discuta seu enfoque se ela e o marido desejarem terminar a gestação com 32 semanas de gestação.

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Síndrome de Prader-Willi

(Ausência de 15q11-q13 de Origem Paterna)

Dissomia Cromossômica Uniparental

Fundamentos

- *Imprinting*
- Dissomia uniparental
- Microdeleção
- Recombinação entre seqüências repetidas de DNA

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: lactância
- Dificuldades de alimentação na lactância
- Hiperfagia e obesidade na infância
- Hipotonia
- Prejuízo cognitivo
- Esterilidade
- Dismorfismo

História e Achados Físicos

J.T. nasceu na 38.ª semana de gestação, após uma gravidez e parto sem complicações. Ele era o segundo filho de genitores não-consangüíneos. Logo após o nascimento, seus genitores e as enfermeiras notaram que J.T. era hipotônico e alimentava-se pouco. Seus genitores e a irmã mais velha estavam com boa saúde. J.T. não tinha uma história familiar de distúrbios neuromusculares, de desenvolvimento, genéticos ou de alimentação. A revisão do registro médico do paciente não revelou uma história de convulsões manifestas, danos hipóxicos, infecção, anomalias cardíacas ou anomalias de glicose ou eletrólitos sanguíneos. Ao exame, J.T. não tinha sofrimento respiratório ou características dismórficas, exceto uma bolsa escrotal hipoplásica e criptorquidismo. Seu peso e sua altura eram apropriados para a idade gestacional. Ele era gravemente hipotônico, com letargia, choro fraco, reflexos diminuídos e pouca sucção. A avaliação subseqüente incluiu testes para infecções congênitas, imagens cerebrais de ressonância magnética, nível de amônia sanguínea e avaliação de ácidos orgânicos na urina, triagem de aminoácidos, avaliação de hipotireoidismo e um cariótipo com fluorescência de hibridização *in situ* (FISH) para a deleção do locus da síndrome de Prader-Willi (cromossomo 15q11-q13) (ver Cap. 9). Os resultados dos testes foram normais, exceto para FISH, que mostrou uma deleção do cromossomo 15q11-q13. O geneticista explicou aos genitores que J.T. tinha síndrome de Prader-Willi (PWS). Após várias explicações e reflexão, os genitores de J.T. decidiram que eram incapazes de cuidar de uma criança incapacitada e deram J.T. para adoção.

Bases

Etiologia da Doença

A PWS é um distúrbio pan-étnico causado pela perda de expressão de genes em 15q11-q13 de origem paterna. A perda de genes de expressão paterna surge por vários mecanismos. Cerca de 70% dos pacientes têm uma deleção de 15q11-q13, 25% têm dissomia uniparental, menos de 5% têm mutações dentro do elemento de controle de *imprinting* e menos de 1% dos pacientes têm uma anomalia cromossômica (ver Cap. 5). A PWS tem uma incidência de 1 em 10.000 a 1 em 15.000 nativivos.

Patogenia

Muitos genes dentro da região 15q11-q13 são diferencialmente expressos dependendo da região ser herdada do pai ou da mãe. Em outras palavras, muitos genes expressos por 15q11-q13 paterno não se expressam em 15q11-q13 materno e vice-versa. Este fenômeno de expressão diferencial de um gene dependendo de ser herdado do pai ou da mãe é conhecido como *imprinting* (ver Cap. 5). A manutenção da expressão correta de genes imprintados requer a remoção do *imprint* na passagem pela linhagem germinativa. Isto é, os *imprints* paternos são mudados para maternos ao passar pela linhagem germinativa materna, e os *imprints* maternos são mudados para paternos ao passar pela linhagem germinativa paterna. A mudança de *imprinting* na passagem pela linhagem germinativa é regulada pelo elemento de controle de *imprinting* e refletida por mudanças na expressão gênica que regula a metilação do DNA.

A deleção de 15q11-q13 durante a meiose masculina origina crianças com PWS porque as crianças que herdam um espermatozóide que possua a deleção não serão capazes de expressar genes ativos apenas do 15q11-q13 de origem paterna. O mecanismo subjacente a esta deleção recorrente é uma recombinação incorreta entre seqüências repetidas flanqueadoras do intervalo da deleção. Menos comumente, a herança de uma deleção que envolve esta região ocorre quando um paciente herda um cariótipo não-balanceado de um genitor que tem uma translocação balanceada.

A falha na mudança de *imprints* maternos durante a meiose masculina para *imprints* paternos origina crianças com PWS porque as crianças derivadas de um espermatozóide com 15q11-q13 maternamente imprintado não serão capazes de expressar genes ativos apenas no 15q11-q13 paternamente imprintado. A falha de *imprinting* surge por mutações dentro do elemento de controle do *imprinting*.

A dissomia uniparental também origina PWS porque a criança tem dois cromossomos 15 maternos e nenhum cromossomo 15 paterno. A dissomia uniparental é tida como se desenvolvendo secundariamente à correção da trissomia, isto é, perda do cromossomo 15 paterno pelo concepto com trissomia do cromossomo 15 secundária à não-disjunção materna.

A despeito das observações de que a perda de 15q11-q13 paternamente imprintado origina PWS, e a despeito da identificação de muitos genes imprintados dentro desta região, a causa exata da PWS ainda é desconhecida. Nenhum produto gênico anormal associado à PWS foi identificado.

Fenótipo e História Natural

No início da lactância, a PWS é caracterizada por grave hipotonia, dificuldades de alimentação e hipogonadismo com criptorquidismo. A hipotonia melhora com o tempo, embora os adultos ainda fiquem levemente hipotônicos. O hipogonadismo, que é de origem hipotalâmica, não melhora com o tempo e geralmente causa desenvolvimento pubescente retardado e incompleto, bem como infertilidade. As dificuldades de alimentação em geral se resolvem no primeiro ano de vida e entre 1 e 6 anos os pacientes desenvolvem extrema hiperfagia e comportamentos de procura por comida (acumular, saquear e roubar). Este comportamento e uma taxa metabólica baixa causam uma obesidade acentuada. A obesidade é a principal causa de morbidade, incluindo doença cardiopulmonar e diabetes melito tipo 2. A longevidade pode ser quase normal, se a obesidade for evitada.

A maioria das crianças com PWS tem um retardo do desenvolvimento motor e da linguagem, bem como um leve retardo mental (QI médio de 60 a 80) e graves distúrbios de aprendizagem. Elas também têm problemas comportamentais, incluindo crises temperamentais, distúrbios obsessivo-compulsivos e pouca adaptação a mudanças de rotina. Estes

problemas de comportamento continuam até a vida adulta e são muito incapacitantes. Cerca de 5% a 10% dos pacientes também desenvolvem psicoses durante o início da vida adulta.

Outras anomalias associadas à PWS incluem baixa estatura, escoliose, osteoporose e dismorfismo. As características dismórficas incluem um diâmetro bifrontal estreito, olhos amendoados, boca triangular e mãos e pés pequenos (Fig. C 25). Além disso, muitos pacientes têm hipopigmentação do cabelo, dos olhos e da pele.

Tratamento

Embora em geral se suspeite de PWS com base na história e nas características físicas, um diagnóstico da doença é definido pela ausência de um 15q11-q13 paternamente imprintado. A perda do *imprinting* paterno é detectada pela análise do DNA mostrando que os genes imprintados só têm um padrão de metilação materno. Se os estudos de DNA confirmarem a PWS, a informação genética requer um cariótipo subseqüente e FISH para 15q11-q13, para que seja determinado se a PWS surgiu da herança de uma translocação cromossômica.

Atualmente nenhuma medicação está disponível para tratar a hiperfagia. A dieta e os exercícios ainda são os principais meios de controlar a obesidade. A reposição de hormônios sexuais promove as características sexuais secundárias, mas freqüentemente piora os problemas comportamentais nos homens e aumenta o risco de derrame nas mulheres. O tratamento comportamental e os inibidores de recaptação de serotonina são as terapias mais efetivas atualmente disponíveis para o distúrbio comportamental. Os pacientes adultos em geral têm melhor desempenho em abrigos (lares coletivos) e ambientes de trabalho.

Risco de Herança

O risco de PWS recorrente em crianças futuras de genitores está relacionado à causa molecular. Para defeitos de *imprinting*, o risco pode ser tão alto quanto 50%, enquanto para deleção de 15q11-q13 ou dissomia uniparental materna o risco de recorrência é menor que 1%. O risco de recorrência quando um genitor possui uma translocação balanceada depende da translocação, mas pode ser tão alto quanto 25%. Hoje em dia, todos os pacientes relatados com PWS com translocação não-balanceada tiveram um rearranjo cromossômico *de novo*.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. A síndrome de Angelman também surge de defeitos de *imprinting* de 15q11-q13. Compare e contraste os fenótipos e mecanismos moleculares causadores das síndromes de Prader-Willi e Angelman.
2. Como o *imprinting* pode explicar os fenótipos associados à triploidia?
3. A síndrome de Beckwith-Wiedemann e a síndrome de Russell-Silver também parecem ser causadas pela expressão anormal de genes imprintados. Explique.
4. Os pais de J.T. o colocaram para adoção. A informação genética deveria ter sido dada de modo diferente? O que é informação genética não-direcionada?

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Síndrome de Turner

(Monossomia Feminina do X)

Cromossômica

Fundamentos

- Não-disjunção
- Seleção pré-natal
- Haploinsuficiência

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: pré-natal
- Baixa estatura
- Disgenesia ovariana
- Imaturidade sexual

História e Achados Físicos

L W , uma menina de 14 anos, foi encaminhada a uma clínica de endocrinologia para avaliação de ausência de características sexuais secundárias (menstruação e desenvolvimento de mamas). Embora tenha nascido pequena para a idade gestacional, ela estava com boa saúde e tinha intelecto normal Nenhum outro membro da família tinha problemas similares Os achados de seu exame eram normais, exceto por sua baixa estatura, estágio 1 do desenvolvimento sexual de Tanner e um tórax largo, com mamilos muito espaçados Após uma breve conversa sobre as causas da baixa estatura e do desenvolvimento sexual retardado ou ausente, seu médico solicitou um nível de hormônio folículo estimulante (FSH), nível de hormônio do crescimento (GH), análise de idade óssea e análise cromossômica Estes testes mostraram um nível normal de hormônio do crescimento, um nível elevado de FSH e um cariótipo anormal (45,X) O médico explicou que L W. tinha síndrome de Turner (TS) L W foi tratada com suplementos de hormônio do crescimento para maximizar seu crescimento linear. Um ano depois, ela começou uma terapia de estrogênio e progesterona para induzir o desenvolvimento de características sexuais secundárias

Bases

Etiologia da Doença

A TS é uma síndrome pan-étnica causada pela ausência parcial ou completa de um segundo cromossomo X nas mulheres Ela tem uma incidência entre 1 em 2 000 a 1 em 5 000 meninas nativivas. Cinqüenta por cento das TS estão associadas ao cariótipo 45,X; 25% estão associadas a uma anomalia estrutural do segundo cromossomo X e 25%, a um mosaicismo 45,X (ver Cap 10)

A monossomia do cromossomo X pode surgir ou pela falha de incluir um cromossomo sexual em um dos gametas ou pela perda de um cromossomo sexual do zigoto ou embrião inicial A falha em incluir um cromossomo sexual em um gameta é a causa mais comum de um cariótipo 45,X De 70% a 80% das pacientes com um cariótipo 45,X são concebidas de um espermatozóide sem cromossomo sexual A perda de um cromossomo sexual por uma célula no embrião inicial é provavelmente a causa do mosaicismo 45,X

Patogenia

O mecanismo pelo qual a monossomia do cromossomo X causa a TS em meninas é pouco compreendido O cromossomo X contém vários loci necessários para a manutenção ovariana e a fertilidade feminina Embora o desenvolvimento dos ovócitos necessite apenas de um cromossomo X, a manutenção destes ovócitos precisa de dois cromossomos X Na ausência de um cromossomo X, portanto, os ovócitos nos fetos e neonatos com TS degeneram, e seus ovários atrofiam em fitas de tecido fibroso As bases genéticas de outras características de TS, tais como higroma cístico, linfedema, tórax largo, anomalias cardíacas, anomalias renais e déficit de audição sensório-neural não foram definidas, mas supostamente refletem algum grau de haploinsuficiência de um ou mais gene(s) ligado(s) ao X

Fenótipo e História Natural

Embora os conceptos 45,X correspondam a 1% a 2% de todas as gestações, menos de 1% dos conceptos 45,X resultam em um nativivo Em vista do fenótipo brando observado nas pacientes com TS, esta alta taxa de abortos é marcante e sugere que um segundo cromossomo X é necessário para a sobrevida intra-uterina

Todas as pacientes com TS têm baixa estatura e mais de 90% têm disgenesia ovariana A disgenesia ovariana é suficientemente grave para que apenas de 10% a 20% das pacientes tenham desenvolvimento pubescente espontâneo (crescimento de mamas e pêlos pubianos) e apenas de 2% a 5% tenham menstruações espontâneas Muitas pessoas também têm anomalias físicas, tais como pescoço alado, implantação baixa dos cabelos, tórax largo, anomalias cardíacas, anomalias renais, déficit auditivo sensório-neural, edema das mãos e dos pés e unhas displásicas Quase 50% das pacientes têm valva aórtica bicúspide e, portanto, um risco aumentado de dilatação da raiz aórtica Quase 60% têm anomalias renais e, portanto, um risco aumentado de disfunção renal

A maioria das pacientes tem desenvolvimento intelectual normal Aquelas com prejuízo intelectual em geral têm uma anomalia estrutural do cromossomo X Socialmente, as pessoas com TS tendem a ser tímidas e retraídas (ver Cap 10)

Além das complicações resultantes de suas anomalias congênitas, as mulheres com TS têm uma incidência aumentada de fraturas osteoporóticas, tireoidite, diabetes melito tipo 1 e tipo 2, doença inflamatória intestinal e doença cardiovascular As causas de diabetes melito, distúrbios da tireóide e doença intestinal inflamatória não estão claras A deficiência de estrogênio, entretanto, provavelmente é a maior responsável pela osteoporose e pela incidência aumentada de aterosclerose, doença cardíaca isquêmica e derrame, embora a diabetes melito provavelmente acentue os efeitos cardiovasculares da deficiência de estrogênio

Tratamento

Quando a estatura de uma paciente TS cai abaixo do 5.° percentil, ela geralmente é tratada com suplementos de hormônio do crescimento até que sua idade óssea chegue aos 15 anos (Fig C 26) Em média, este tratamento resulta em um ganho de 10 cm na altura prevista A melhora na altura final diminui quanto mais tarde é iniciada a terapia com hormônio do crescimento A terapia concomitante de estrogênio diminui a efetividade do hormônio do crescimento

A terapia de estrogênio em geral é iniciada com cerca de 14 a 15 anos de idade para promover o desenvolvimento das características sexuais secundárias A terapia com progesterona é adicionada ao regime para induzir menstruações, seja na época do primeiro sangramento vaginal seja no segundo ano da terapia de estrogênio

Além disso, o tratamento médico em geral inclui a ecocardiografia, para avaliação da dilatação da raiz da aorta e doença cardíaca valvar, um ultra-som renal, para avaliação de anomalias renais congênitas, e um teste de tolerância à glicose, para detecção de diabetes

As pacientes que têm disgenesia ovariana completa não ovulam espontaneamente nem têm filhos Se tiverem um funcionamento cardiovascular e renal adequado, entretanto, as mulheres com TS podem ter filhos usando a fertilização *in vitro* e doação de ovócitos

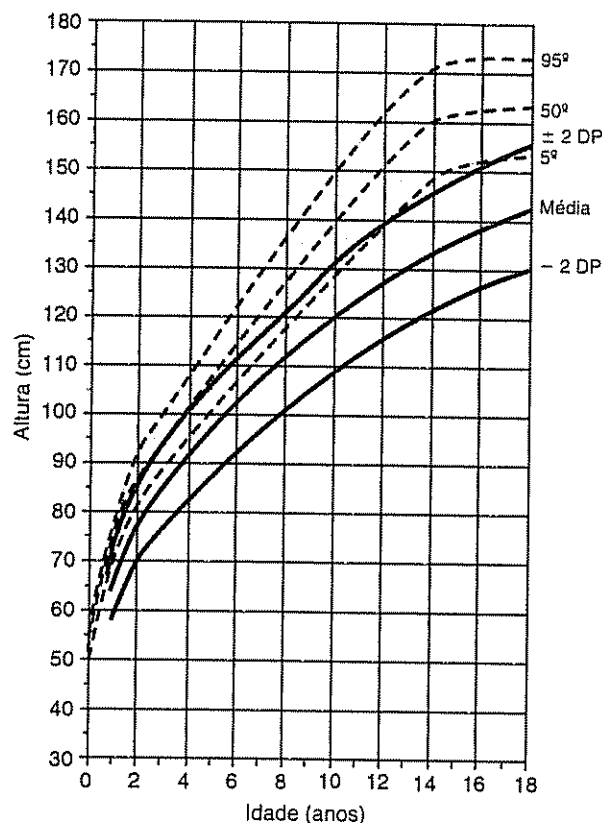



Fig. C.26 Curvas de crescimento de meninas normais (*sombreadas*) e de meninas com síndrome de Turner Nenhuma das meninas recebeu tratamento hormonal (Adaptada de Lyon A J. Preece M. A., Grant D B. (1985) Arch Dis Child 60:932, com permissão de BMJ Publishing Group)

Risco de Herança

A TS não está associada à idade materna ou paterna avançada. Embora tenham ocorrido algumas recorrências familiares, a TS em geral é esporádica, e o risco empírico de recorrência para gestações futuras não é aumentado em relação à população geral Caso se suspeite de TS com base em achados de ultra-som fetal, tais como um higroma cístico, o diagnóstico deve ser confirmado pela cariotipagem de vilosidades coriônicas ou amniócitos.

Apenas algumas gestações têm sido relatadas entre as pacientes TS com menstruação espontânea Na prole resultante, um em três tem anomalias congênitas, tais como doença cardíaca congênita, síndrome de Down e espinha bífida A causa ou causas deste risco aumentado para anomalias congênitas ainda não foi definida

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Algumas observações sugeriram que as pacientes com TS que herdam um cromossomo X paterno são mais extrovertidas e têm melhor adaptação social que aquelas que herdam um cromossomo X materno Que mecanismos moleculares podem explicar isto?
2. A monossomia do cromossomo X é a unica monossomia humana viável Discuta os possíveis motivos
3. Discuta os possíveis motivos para a alta taxa de defeitos de nascimento entre os filhos de mulheres com TS
4. A não-disjunção meiótica materna dá origem mais freqüentemente à síndrome de Down, e a não-disjunção meiótica paterna, à síndrome de Turner Discuta as possíveis razões
5. Discuta o suporte psicossocial e a informação que são apropriadas e necessárias para pacientes com TS

Referências

Saenger P (1996) Turner's syndrome N Engl J Med 335:1749–1754.

Zinn AR, Ross JL (1998) Turner syndrome and haploinsufficiency Curr Opin Genet Dev 8:322–327.

Síndrome do X Frágil

(Mutação FMRI)

Ligada ao X

Fundamentos

- Expansão de repetição de trincas
- Mosaicismo somático
- Antecipação sexo-específica
- Metilação
- Efeito de haplótipo

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância
- Deficiência mental
- Face dismórfica
- Macroorquidismo masculino

História e Achados Físicos

R.L., um menino de 6 anos, foi encaminhado a uma clínica de pediatria do desenvolvimento para avaliação de retardo mental e hiperatividade. Ele não havia se adaptado ao jardim-de-infância porque era perturbador, incapaz de executar as tarefas e tinha poucas habilidades motoras e de fala. Seu desenvolvimento estava retardado, mas ele não tinha perdido os marcos desenvolvimentais: sentou-se aos 10 ou 11 meses, andou aos 20 meses e falou de duas a três palavras claras aos 24 meses. Possuía boa saúde. Sua mãe e sua tia materna haviam tido pequenos distúrbios de aprendizagem na infância, e um tio materno tinha retardo mental. Os achados de seu exame físico foram normais, exceto pela hiperatividade. O médico recomendou vários testes, incluindo um cariótipo, estudos do funcionamento da tireóide e análise do DNA para a síndrome do X frágil. A análise da transferência de Southern para o gene *FMR1* foi compatível com a síndrome do X frágil.

Bases

Etiologia da Doença

A síndrome do X frágil é um distúrbio de retardo mental ligado ao X que é causado por mutações no gene *FMR1* em Xq27.3 (ver Cap. 12). A síndrome do X frágil tem uma prevalência de 16 a 25 por 100.000 na população geral masculina e a metade disto na população geral feminina. A síndrome do X frágil contribui com 3% a 6% do retardo mental entre os meninos que têm uma história familiar positiva de retardo mental e não têm defeitos de nascimento.

Patogenia

O produto do gene *FMR1*, Fmrp, é expresso em muitos tipos de células, mas com mais abundância nos neurônios. Fmrp pode levar uma subclasse de mRNA do núcleo para a maquinaria de tradução.

Mais de 99% das mutações de *FMR1* são expansões de uma seqüência repetida $(CGG)_n$ na região 5' não-traduzida do gene (ver Cap. 12). Nos alelos normais de *FMR1*, o número de repetições CGG varia de 6 a aproximadamente 50. Nos alelos causadores de doença ou mutações totais, o número de repetições é de mais de 230. Os alelos com mais de 230 repetições CGG em geral têm hipermetilação da seqüência CGG repetida e o promotor de *FMR1* adjacente (Fig. C.27). A hipermetilação inativa o promotor de *FMR1*, causando a perda da expressão de Fmrp.

As mutações totais surgem de alelos pré-mutados (cerca de 55 a 230 repetições CGG) com transmissão materna de um alelo mutante de *FMR1*, mas sem transmissão paterna. Na verdade, as pré-mutações em geral se encurtam com a transmissão paterna. As mutações totais não surgem de alelos normais. Como o tamanho de uma repetição CGG aumenta a cada geração se for transmitida pela mulher, os números crescentes de prole afetada geralmente são observados nas últimas gerações de uma família afetada. Este fenômeno é a antecipação genética.

O risco de expansão de uma pré-mutação para uma mutação total aumenta à medida que o tamanho da pré-mutação aumenta (ver Fig. C.27). No entanto, nem todas as pré-mutações são igualmente predispostas a se expandir, pois, embora as pré-mutações sejam relativamente comuns, a progressão para uma mutação total só foi observada em um número limitado de haplótipos, isto é, há uma predisposição haplotípica para a expansão. Esta predisposição haplotípica pode estar parcialmente relacionada à presença de trincas AGG inseridas em uma seqüência de repetições CGG. Estas trincas AGG parecem inibir a expansão de uma seqüência de repetições CGG.

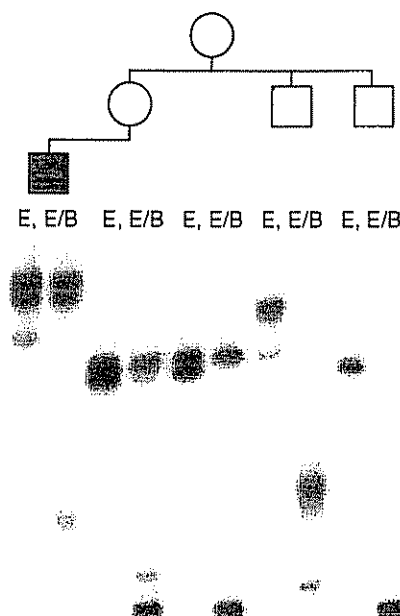



Fig. C.27 Transferência de Southern mostrando uma segregação familiar de pré-mutações *FMR1* e expansão de uma pré-mutação para uma mutação total na terceira geração. Notar que a avó não-afetada tem uma quantidade muito pequena da pré-mutação, a mãe não-afetada tem uma quantidade maior de uma pré-mutação um pouco maior e o menino afetado tem a mutação total. A avó também tem um filho levemente afetado com uma mutação total que não está metilada e um filho com um alelo normal.

O DNA genômico foi digerido com a endonuclease *Eco*RI (E) isolada ou em combinação com *Bss*H2(EB). A expansão da repetição CGG foi detectada usando uma sonda da ponta 5' do gene *FMR1*; a banda normal *Eco*RI tem 5,2 kb e a banda normal *Eco*RI/*Bss*H2 tem 2,8 kb. Como a digestão de *Bss*H2 é inibida pela metilação do DNA, ela não corta dentro das repetições metiladas CGG do alelo *FMR1* no X inativo ou uma mutação *FMR1* total metilada. (Cortesia de P. Ray, The Hospital for Sick Children e University of Toronto.)

Fenótipo e História Natural

A síndrome do X frágil causa um retardo mental moderado nos homens afetados e um leve retardo nas mulheres afetadas. A maioria dos indivíduos afetados também tem anomalias de comportamento, incluindo hiperatividade, abanar ou morder de mãos, descontroles temperamentais, pouco contato de olhos e características autísticas. As características físicas dos homens variam com relação à puberdade: antes da puberdade têm a cabeça um pouco grande, mas poucas outras características distintivas, enquanto após a puberdade eles freqüentemente têm características mais distintivas (face longa com mandíbula e testa proeminentes, orelhas grandes e macroorquidismo). Como estes achados clínicos não são únicos da síndrome do X frágil, o diagnóstico depende da detecção molecular das mutações. Os pacientes com síndrome do X frágil têm um tempo de vida normal.

Quase todos os homens e de 40% a 50% das mulheres que herdam a mutação total terão a síndrome do X frágil. A gravidade do fenótipo depende do mosaicismo do tamanho da repetição e da metilação da repetição. Como as mutações totais são mitoticamente instáveis, alguns pacientes têm uma mistura de células com tamanhos de repetições que variam desde a pré-mutação até a mutação total (mosaicismo do tamanho da repetição). Todos os homens com mosaicismo do tamanho da repetição são afetados, mas em geral têm um funcionamento mental melhor que aqueles com uma mutação total em todas as células. As mulheres com mosaicismo do tamanho da repetição são desde normais até totalmente afetadas. De modo semelhante, alguns pacientes têm uma mistura de células com e sem metilação da repetição CGG (metilação da repetição). Todos os homens com mosaicismo de metilação são afetados, mas em geral têm um funcionamento mental melhor que aqueles com hipermetilação em todas as células. As mulheres com mosaicismo de metilação são desde normais até totalmente afetadas. Muito raramente, os pacientes têm uma mutação total que não é metilada em todas as células. Sejam masculinos ou femininos, estes pacientes variam de normais a totalmente afetados. Além disso, nas mulheres, o fenótipo depende do grau de desvio de inativação do cromossomo X (ver Cap. 5).

Tratamento

Nenhum tratamento curativo está atualmente disponível para a síndrome do X frágil. A terapia enfoca a intervenção educacional e o tratamento farmacológico dos problemas de comportamento

Risco de Herança

O risco de uma mulher com uma pré-mutação ter um filho afetado é determinado pelo tamanho da pré-mutação, pelo sexo do feto e pela história familiar. Empiricamente, o risco de recorrência pode ser tão alto quanto 50% para cada filho e 25% para cada filha. Com base na análise de um número relativamente pequeno de mães portadoras, entretanto, o risco de recorrência parece declinar deste risco empírico à medida que a pré-mutação decresce de 100 para 56 repetições. Para uma pré-mutação de 56 a 59 repetições, portanto, o risco de recorrência é de aproximadamente 7% para um filho afetado e 3,5% para uma filha afetada. O teste pré-natal está disponível usando o DNA fetal obtido de vilosidades coriônicas ou amniocentese.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Discuta a tendenciosidade do haplótipo na doença, isto é, o efeito do haplótipo no desenvolvimento da mutação (síndrome do X frágil), na gravidade da doença (anemia falciforme) ou na predisposição à doença (doenças auto-imunes).
2. A síndrome do X frágil, a distrofia miotônica, a ataxia de Friedreich, a doença de Huntington e vários outros distúrbios são causados pela expansão de seqüências repetidas. Contraste os mecanismos ou proponha mecanismos pelos quais a expansão da repetição causa doença para cada um destes distúrbios. Por que alguns destes distúrbios apresentam antecipação enquanto outros não?
3. A tendenciosidade do sexo na transmissão das mutações *FMR1* é tida como tendo surgido porque a expressão de Fmrp é necessária para a produção de espermatozóides viáveis. Compare a tendenciosidade na transmissão sexual da síndrome do X frágil com a doença de Huntington. Discuta mecanismos que possam explicar as tendenciosidades na transmissão pelos sexos de várias doenças.
4. Que história familiar e informação diagnóstica são necessárias antes de se fazer um diagnóstico pré-natal da síndrome do X frágil?
5. Como você informaria uma mulher grávida portadora de um feto 46,XY com 60 repetições? E um feto 46,XX com 60 repetições? E um feto 46,XX com mais de 300 repetições?

Referências

GeneClinics
http://www.geneclinics.org/

Warren ST, Sherman SL (2001) The fragile X syndrome. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed, McGraw-Hill, New York, pp. 1257–1280.

Talassemia

(Deficiência de Globina α ou β)

Autossômica Recessiva

Fundamentos

- Vantagem do heterozigoto
- Variação étnica de freqüências alélicas
- Dosagem gênica

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância
- Anemia microcítica hipocrômica
- Hepatosplenomegalia
- Hematopoese extramedular

História e Achados Físicos

J.Z., uma saudável mulher canadense de 25 anos, foi ao obstetra para uma visita pré-natal rotineira. Os resultados de sua contagem total do sangue mostraram uma leve anemia microcítica (hemoglobina [Hb], 98 g/L; volume corpuscular médio de 75 μm^3). Ela era de origem vietnamita, e seu marido, T.Z., era de origem grega. J.Z. não tinha conhecimento de nenhum distúrbio sanguíneo em sua família ou na família de T.Z. Entretanto, a eletroforese de Hb mostrou uma leve elevação de Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) e Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), que sugeria que J.Z. tinha β-talassemia. O teste molecular detectou uma mutação sem sentido em um alelo de β-globina e nenhuma deleção de α-globina. Os resultados dos testes de T.Z. mostraram que ele também tinha uma mutação sem sentido de um alelo de β-globina e nenhuma deleção de α-globina. Após o encaminhamento a uma clínica de genética, o geneticista explicou a J.Z. e T.Z. que seu risco de ter uma criança com β-talassemia *major* era de 25%. Após discutirem o diagnóstico pré-natal, J.Z. e T.Z. optaram por levar a gestação a termo sem outras investigações.

Bases

Etiologia da Doença

As talassemias são anemias autossômicas recessivas causadas pela síntese deficiente de globina alfa ou beta em relação à outra cadeia. Uma deficiência relativa de globina α causa α-talassemia e uma deficiência relativa de globina β causa uma β-talassemia (ver Cap. 11).

A talassemia predomina entre as pessoas do Mediterrâneo, da África, do Oriente Médio, da Índia, da China e entre os descendentes do sudeste da Ásia. As talassemias parecem ter evoluído porque conferem alguma resistência à malária (ver Cap. 7). Assim, a prevalência da talassemia em um grupo étnico reflete a exposição passada e atual de uma população à malária. A prevalência de α-talassemia varia de menos de 0,01% — os nativos das áreas sem malária, tais como o Reino Unido, a Islândia e o Japão — até aproximadamente 49% — entre os nativos de algumas ilhas do sudeste do Pacífico. A doença da hemoglobina H e a hidropisia fetal (Quadro) são restritas ao Mediterrâneo e ao sudeste da Ásia. A incidência de β-talassemia varia de cerca de 1,5% — entre os africanos e afro-americanos — a 30% — em algumas aldeias da Sardenha.

Patogenia

A talassemia surge da produção inadequada de Hb e do acúmulo não-balanceado de subunidades de globina. A produção inadequada de Hb causa hipocromia e microcitose. O acúmulo desbalanceado de globina causa eritropoese inefetiva e anemia hemolítica. A gravidade da talassemia é proporcional à gravidade do desequilíbrio entre a globina α e a globina β.

Quase 200 mutações diferentes foram associadas à talassemia. Contudo, apenas algumas mutações contribuem para a maioria das talassemias. A deleção de genes de globina α contribui com 80% a 85% da α-talassemia e aproximadamente 15 mutações contribuem com mais de 90% da β-talassemia. Os estudos moleculares das mutações de α-globina e β-globina sugerem fortemente que várias mutações surgiram independentemente em populações diferentes e então atingiram freqüência alta por seleção.

Fenótipo e História Natural

As mutações de globina α são divididas em quatro grupos clínicos que refletem o bloqueio da produção de globina α (ver Quadro).

Os fenótipos observados em uma população refletem os tipos de mutações de globina α nesta população. Os cromossomos com deleção de ambos os genes de globina α são observados no sudeste da Ásia

Fenótipo	N.º de Genes de α-Globina Funcionais	Proporção de α-Globinas α:β	Genótipos de α-Globina	Inclusões de Hb H	Complicações
Normal	4	1	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Nenhuma	Nenhuma
Portador silencioso	3	0,8	$-\alpha/\alpha\alpha$ $--/\alpha\alpha\alpha$	Raras	Nenhuma
Traço de α-Talassemia	2	0,6	$-\alpha/-\alpha$ $--/\alpha\alpha$	Ocasionais	Anemia branda
Doença de Hb H	1	0,3	$--/-\alpha$	Muitas	Anemia moderada, icterícia, hepatosplenomegalia, cálculos biliares, aumento de suscetibilidade à infecção, deficiência de ácido fólico
Hidropisia fetal	0	0,0	$--/--$	Presentes	Anemia grave, insuficiência cardíaca congestiva, fatal *in utero* ou logo após o nascimento

Fig. C.28 O aspecto facial típico de uma criança com β-talassemia não-tratada Notar os ossos proeminentes na bochecha e a protrusão do maxilar superior, que resulta da expansão da cavidade medular nos ossos do crânio e face. (Cortesia de N Olivieri, The Hospital for Sick Children e University of Toronto)

e na bacia do Mediterrâneo Assim, a doença da hemoglobina H e a hidropisia fetal em geral ocorrem nestas populações e não na África, que geralmente apresenta cromossomos com deleção de um gene de globina α.

As mutações de globina β são divididas em grupos clínicos que refletem o bloqueio da produção de globina β (ver Quadro) A β-talassemia está associada a uma mutação em um alelo de globina β, e a β-talassemia *major* com mutações em ambos os alelos de β-globina. Em geral os pacientes com β-talassemia têm uma leve anemia microcitica, uma leve hiperplasia eritróide de medula óssea e, ocasionalmente, hepatosplenomegalia Em geral são assintomáticos Os pacientes com β-talassemia *major* apresentam-se com anemia quando a produção pósnatal de Hb F diminui A grave anemia hemolítica e a eritropoese inefetiva causam retardo de crescimento, icterícia, hepatosplenomegalia (hematopoese extramedular) e expansão da medula óssea (Fig. C.28). Aproximadamente 80% dos pacientes que não são tratados morrem aos 5 anos. Os pacientes que recebem apenas terapia de transfusão morrem antes dos 30 anos de infecção ou hemocromatose. Os pacientes que recebem terapia de transfusão com terapia de quelação de ferro em geral sobrevivem além da terceira década A sobrecarga de ferro das repetidas transfusões e o aumento de absorção intestinal causam complicações cardíacas, hepáticas e endócrinas

Tratamento

A triagem inicial de α ou β-talassemia em geral é feita pela determinação dos índices de eritrócitos. Para os pacientes sem anemia por deficiência de ferro, o diagnóstico de β-talassemia em geral é confirmado pela determinação quantitativa de Hb A_2 e Hb F ou pela análise de mutação no DNA, ou ambas Sem associação com a Hb A_2 ou Hb F, a α-talassemia é confirmada pela análise de mutação no DNA ou pela demonstração de uma alta proporção de β/α-globina.

O tratamento da doença de hemoglobina H é principalmente de apoio. A terapia inclui suplementação de folato, evitar drogas oxidantes e ferro, pronto tratamento das infecções e transfusão criteriosa A esplenectomia raramente é necessária.

O tratamento da β-talassemia inclui transfusões, quelação de ferro, imediato tratamento das infecções e, freqüentemente, esplenectomia. O transplante de medula óssea é a única cura hoje disponível

Risco de Herança

Se cada genitor for heterozigoto para β-talassemia, o casal tem um risco de 25% de ter um filho com β-talassemia *major* e um risco de 50% de ter um filho heterozigoto para β-talassemia Se um genitor for heterozigoto para β-talassemia e o outro tiver uma triplicação do gene de globina α, este casal também pode ter um risco de 25% de ter um filho com β-talassemia *major*.

Para genitores heterozigotos para α-talassemia, o risco de ter um filho com doença da Hb H ou hidropisia fetal depende da natureza de suas mutações de α-globina. Os genitores com α-talassemia podem ter o genótipo $-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha\alpha$. Portanto, dependendo de seus genótipos, eles têm um risco de 25% de ter um filho com doença da Hb H ou hidropisia fetal.

Tanto para a talassemia α quanto β, o diagnóstico pré-natal é possível por análise molecular do DNA fetal tanto de vilosidades coriônicas quanto de amniócitos. O diagnóstico pré-natal molecular de talassemia é mais eficiente se as mutações já tiverem sido identificadas nos genitores portadores.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Um pai tem o genótipo $\alpha\alpha\alpha/\alpha-$, β/β e a mãe $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\beta/-$. Se o filho tiver o genótipo $\alpha -/\alpha\alpha$, $\beta/-$, qual será o fenótipo mais provável? Por quê? Se o genótipo da criança for $\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\beta/-$, qual será o fenótipo mais provável? Por quê?
2. Quais os mecanismos moleculares da deleção do gene de α-globina? Da triplicação do gene de α-globina?
3. Como a expressão da globina γ protege contra a β-talassemia?
4. Descreva a triagem de portadores para talassemia. A que grupos étnicos a triagem de portadores deve ser aplicada? As pessoas dos grupos étnicos classicamente de baixo risco devem ser triadas se seu cônjuge for heterozigoto para talassemia α ou β? Considere a mistura de populações
5. A talassemia α é o distúrbio monogênico mais comum no mundo Três mecanismos podem aumentar a freqüência de uma mutação em uma população: seleção, deriva genética e efeito do fundador Descreva cada mecanismo e o(s) motivo(s) pelo(s) qual(is) a seleção contribui para a alta freqüência de talassemia α.

Referências

Orkin S, Nathan D (1998) The thalassemias. *In* Orkin S, Nathan D (eds) Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. WB Saunders, Philadelphia, pp 811–886

Xeroderma Pigmentoso

(Defeito de Reparo por Excisão de Nucleotídeo)

Autossômico Recessivo

Fundamentos

- Expressividade variável
- Heterogeneidade genética
- Complementação genética

Principais Características Fenotípicas

- Idade de início: infância
- Sensibilidade à luz ultravioleta
- Câncer de pele
- Disfunção neurológica

História e Achados Físicos

W.S., uma menina de 3 anos, foi encaminhada a uma clínica dermatológica para avaliação de grande sensibilidade ao sol e sardas. Ao exame físico, ela apresentava fotofobia e tinha conjuntivite, bem como sardas hiperpigmentadas proeminentes nas áreas expostas ao sol. Sob outros aspectos, seu desenvolvimento e achados do exame físico eram normais. W.S. era filha de genitores japoneses não-consangüíneos. Ninguém mais na família tinha sido similarmente afetado. O dermatologista explicou que W.S. tinha as características clássicas de xeroderma pigmentoso (XP), isto é, "pele pigmentada tipo pergaminho". Para confirmar o diagnóstico, W.S. submeteu-se a uma biópsia de pele para avaliar o reparo do DNA e a sensibilidade à radiação ultravioleta (UV) nos fibroblastos de sua pele. Os resultados deste teste confirmaram o diagnóstico de XP. A despeito das medidas preventivas apropriadas, W.S. desenvolveu melanoma metastático aos 15 anos de idade e morreu 2 anos mais tarde. Seus genitores tiveram mais dois filhos, nenhum deles afetado pelo XP.

Bases

Etiologia da Doença

O XP é um distúrbio genético autossômico recessivo heterogêneo pan-étnico do reparo de DNA, que causa uma acentuada sensibilidade à irradiação UV. Nos EUA e na Europa, a prevalência é de aproximadamente 1 em 1 milhão, mas no Japão a prevalência é de 1 em 100.000 (ver Cap. 9).

Patogenia

O reparo dos danos ao DNA pela irradiação UV ocorre por três mecanismos: reparo por excisão, reparo de pós-replicação e fotorreativação. O reparo de excisão corrige os danos ao DNA pelo reparo de excisão de nucleotídeo ou reparo de excisão de base. O reparo pós-replicação é um mecanismo de tolerância a danos que permite a replicação do DNA em um molde danificado. A fotorreativação reverte o DNA danificando ao estado químico normal sem remover ou trocar qualquer material genético.

O reparo por excisão de nucleotídeo é um processo complexo, mas versátil, que envolve pelo menos 30 proteínas. O princípio básico é a remoção de um pequeno segmento unifilamentar de DNA contendo uma lesão pela incisão dupla do filamento danificado e subseqüente síntese de reparo por preenchimento do espaço, usando o filamento complementar intato como molde. Dentro dos genes transcritos, o dano ao DNA bloqueia a progressão da RNA polimerase II. A RNA polimerase II parada inicia o reparo por excisão de nucleotídeo (reparo acoplado à transcrição). No restante do genoma e nos filamentos não-transcritos dos genes, um complexo de reparo por excisão de nucleotídeo identifica o dano ao DNA pela detecção de distorções da hélice dentro do DNA (reparo do genoma global).

Ocasionalmente, o reparo por excisão de nucleotídeo não repara a lesão antes da replicação do DNA. Como tais lesões inibem a progressão da replicação do DNA, o reparo pós-replicação ultrapassa a lesão, permitindo que a síntese de DNA continue. A DNA polimerase η medeia a síntese translesional de DNA. Ela catalisa eficiente e precisamente a síntese através das lesões de ditimidinas.

O XP é causado por mutações que afetam a subvia de reparo do genoma global de excisão de nucleotídeos ou por mutações que afetam o reparo pós-replicação. Em contraste, a síndrome de Cockayne, um distúrbio correlato, é causada por mutações que afetam a subvia de reparo de transcrição acoplada da excisão de nucleotídeos. O XP e a síndrome de Cockayne foram separados em 10 grupos de complementação bioquímica. Cada grupo reflete uma mutação de um componente diferente do reparo de excisão de nucleotídeos ou reparo pós-replicação (Quadro).

A capacidade reduzida ou ausente de reparo do genoma global ou reparo pós-replicação resulta no acúmulo de mutações dentro das células. As neoplasias cutâneas dos pacientes com XP têm um nível mais alto de mutações oncogênicas e de genes supressores tumorais que os tumores da população normal, e estas mutações parecem ser altamente específicas de UV.

Fenótipo e História Natural

Os pacientes com XP desenvolvem sintomas em uma média de idade de 1 a 2 anos, embora em aproximadamente 5% dos pacientes o início ocorra após os 14 anos. Os sintomas iniciais comumente incluem fá-

Grupo de Complementação	Gene	Processo Afetado	Fenótipo
XPA	*XPA*	Reconhecimento de dano ao DNA	XP
XPB	*ERCC3*	Deselicoidização do DNA	XP-CS, TTD
XPC	*XPC*	Reconhecimento de dano ao DNA	XP
XPD	*ERCC2*	Deselicoidização do DNA	XP, TTD, XP-CS
XPE	*DDB2*	Reconhecimento de dano ao DNA	XP
XPF	*ERCC4*	Endonuclease	XP
XPG	*ERCC5*	Endonuclease	XP, XP-CS
XPV	*POLH*	Síntese translesional de DNA	XP
CSA	*CKN1*	Reparo acoplado à transcrição	CS
CSB	*ERCC6*	Reparo acoplado à transcrição	CS

CS = síndrome de Cockayne; TTD = tricotiodistrofia; XP-CS = fenótipo combinado de XP e síndrome de Cockayne

Fig. C.29 Achados cutâneos e oculares de xeroderma pigmentoso Notar a hiperpigmentação e as lesões papilomatosas e verrucosas da pele e a conjuntivite (Cortesia de M. L Levy, Baylor College of Medicine e Texas Children's Hospital, Houston)

ceis queimaduras solares, fotossensibilidade aguda, sardas e fotofobia. Os danos cutâneos continuados causam um envelhecimento prematuro da pele (afinamento, rugas, lentigos solares, telangiectasia), ceratoses actínicas pré-malignas e neoplasias benignas e malignas (Fig. C 29). Quase 45% dos pacientes desenvolvem carcinomas de célula basal ou de célula escamosa, ou ambos, e aproximadamente 5% desenvolvem melanomas. Noventa por cento dos carcinomas ocorrem em lugares de maior exposição à irradiação UV: face, pescoço, cabeça e ponta da língua. Antes da introdução de medidas preventivas, a média de idade do desenvolvimento de neoplasias cutâneas era de 8 anos, 50 anos mais cedo que a população geral, e a freqüência destas neoplasias era mais de 1.000 vezes maior que a da população geral.

Além dos sintomas cutâneos, de 60% a 90% dos pacientes têm anomalias oculares Os sintomas incluem fotofobia, conjuntivite, blefarite, ectrópio e neoplasia. Novamente, a distribuição de danos oculares e neoplasias corresponde aos locais de maior exposição à irradiação UV.

Aproximadamente 18% dos pacientes apresentam degeneração neuronal progressiva. Os sintomas incluem surdez sensório-neural, retardo mental, espasticidade, hiporreflexia ou arreflexia, desmielinização segmentar, ataxia, coreoatetose e oftalmoplegia supranuclear. A gravidade dos sintomas neurológicos em geral é proporcional à gravidade do déficit de reparo por excisão de nucleotídeos. A neurodegeneração pode resultar de uma inabilidade em reparar danos ao DNA por radicais de oxigênio livre gerados endogenamente.

O reparo por excisão de nucleotídeo também corrige danos ao DNA de muitos carcinógenos químicos, tais como fumo de cigarros, comida grelhada e cisplatina Conseqüentemente, os pacientes têm um aumento de 10 a 20 vezes na incidência de neoplasias internas, tais como tumores cerebrais, leucemia, tumores pulmonares e carcinomas gástricos.

Os pacientes com XP têm um tempo de vida encurtado. Sem proteção preventiva, seu tempo de vida é de cerca de 30 anos a menos que o das pessoas sem XP. O melanoma metastático e o carcinoma de célula escamosa da pele são as causas mais comuns de morte.

Tratamento

A confirmação do diagnóstico de XP é baseada em testes funcionais do reparo de DNA e sensibilidade à irradiação UV. Tais testes em geral são feitos em culturas de fibroblastos de pele. A confirmação diagnóstica pela identificação de mutações no gene associado ao XP não está clinicamente disponível hoje em dia.

O tratamento de pacientes com XP inclui evitar a exposição ao sol, roupas protetoras, proteções físicas e cremes com filtros solares e uma cuidadosa vigilância de excisões de malignidades cutâneas. No momento, nenhum tratamento curativo está disponível.

Risco de Herança

Como XP é uma doença autossômica recessiva, muitos pacientes não têm uma história familiar da doença. Para os genitores que já tiveram um filho afetado por XP, o risco de um futuro filho ter XP é de 1 em 4. O diagnóstico pré-natal é possível por testes funcionais de reparo do DNA e sensibilidade à irradiação UV em amniócitos cultivados ou vilosidades coriônicas.

Questões para Discussão em Pequenos Grupos

1. Defina grupos de complementação e explique seu uso para definir as bases bioquímicas das doenças.
2. Compare e contraste o XP e a síndrome de Cockayne. Por que a síndrome de Cockayne não está associada a um risco aumentado de neoplasia?
3. Os pacientes com XP têm um defeito de imunidade celular cutânea Como a sensibilidade dos pacientes com XP à radição UV pode explicar esta imunodeficiência? Como a imunodeficiência pode contribuir para a suscetibilidade ao câncer?
4. A síndrome de Werner, a síndrome de Bloom, o XP, a ataxia telangiectasia e a anemia de Fanconi são doenças herdadas de instabilidade genômica. Quais são os mecanismos moleculares subjacentes a cada um destes distúrbios? Que tipos de instabilidade genômica estão associados a cada distúrbio?

Referências

de Boer J, Hoeijmakers JHJ (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis 21:453–460.

QUADRO 11-1

Etapas nas Quais as Mutações Podem Perturbar a Formação de Proteína Normal

Anomalias Primárias (Mudanças nas Etapas Diretamente Dependentes da Seqüência de DNA do Gene Estrutural)		Anomalias Secundárias (Mudanças nos Eventos Modificadores ou na Síntese de Moléculas Associadas Necessárias à Função)	
Exemplo de Doença (Muitas Hemoglobinopatias)	*Etapa Afetada*	*Evento Modificado*	*Exemplo de Doença (Várias Doenças, Ver Cap. 12)*
	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS		
Talassemias nas quais a diminuição de mRNA deve-se a deleções ou defeitos em sítios reguladores ou de corte. HPFH: Aumento de transcrição pós-natal	Transcrição	Regulação da transcrição	Porfiria intermitente aguda: Drogas que induzem citocromo P450 diminuem heme livre → indução de ALA sintetase → sintomas
	RNA MENSAGEIRO		
Talassemias que se devem a mRNAs não-funcionais com mutações sem sentido ou mudança de matriz de leitura	Tradução	Regulação de síntese de proteínas	Heme diminuído aumenta tanto a transcrição quanto a tradução de ALA sintetase
	DOBRAMENTO ANORMAL DE POLIPEPTÍDEO		
Treze mutantes diferentes de Hb nos quais um aminoácido em uma hélice α é substituído por prolina, introduzindo dobras que perturbam a hélice e, portanto, a estrutura terciária	Dobramento do polipeptídeo (estrutura secundária e terciária)	Modificações pós-traducionais, p. ex., glicosilação, hidroxilação	Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VI:Deficiência de lisil hidroxilase → colágeno pouco entrecruzado
	CONFORMAÇÃO TRIDIMENSIONAL		
*Acidúria metilmalônica: Um defeito na seqüência líder em um alelo da metilmalonil CoA ácida mutase.	Localização subcelular direcionada pela informação na seqüência de aminoácidos	Localização subcelular dirigida por modificações pós-traducionais do polipeptídeo	Doença da célula I: falha em adicionar marcador de reconhecimento para enzimas lisossômicas
Hb Philly: Uma substituição na interface $\alpha_1:\beta_1$ aumenta a constante de dissociação dos tetrâmeros de Hb em monômeros	Para proteínas multiméricas: – associação de subunidades – interação de subunidades	Formação de complexos multiproteicos e organelas	Síndrome de Zellweger, um defeito na biogênese de peroxissomo
	LOCALIZAÇÃO & MONTAGEM†		
Hb Hammersmith: A bolsa de heme é deformada pela substituição β42 Fen → Ser, uma mudança no heme → baixa afinidade com O_2 → cianose	Localização de co-fator ou grupo prostético (não-covalente ou covalente)	Ligação de co-fator ou grupo prostético (covalente) ou remoção	Deficiência de holocarboxilase sintase; deficiência de biotinidase
	FUNÇÃO BIOLÓGICA		
Hb Kempsey: Interação prejudicada de subunidades bloqueia Hb em seu estado de alta afinidade com O_2. Hb Kansas: Bloqueia Hb em seu estado de baixa afinidade com O_2.	A proteína mutante é normal em absolutamente todos os modos, exceto pelo fato de uma ou mais de suas atividades biológicas estar alterada pela substituição de um aminoácido	Síntese ou transporte de co-fator ou grupo prostético	Mutações no metabolismo de vitamina B_{12} → acidúria metilmalônica e/ou homocistinúria
	DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA		
Mais de 70 hemoglobinas anormais têm estrutura instável decorrente de substituições de aminoácidos ou deleções (p. ex., as substituições de prolina citadas acima) → degradação	Mudanças na seqüência primária de aminoácidos que prejudicam o dobramento e desestabilizam a proteína	Regulação da degradação da proteína	Sem exemplos conhecidos

*A acidúria metilmalônica e a maioria das doenças listadas na coluna 4 serão discutidas no Cap. 12. †Aquela destas duas etapas que ocorre primeiro varia com o tipo de proteína. HPFH = persistência hereditária de hemoglobina fetal.

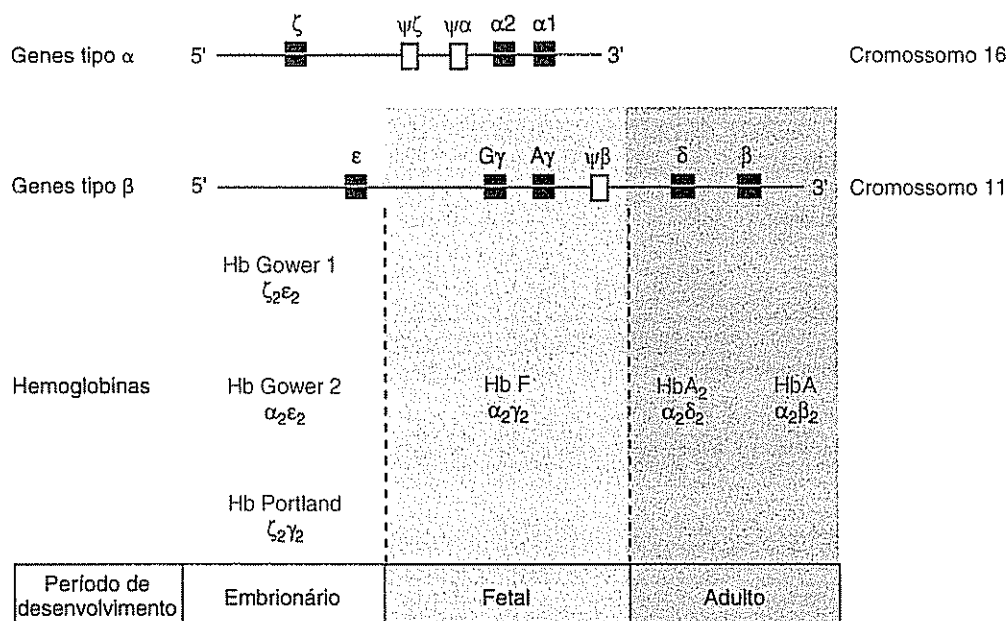



Fig. 11.2 Organização dos genes de globina humana e hemoglobinas produzidas em cada estágio do desenvolvimento humano (Redesenhado de Stamatoyannopoulos G. Nienhuis A W (1987) Hemoglobin switching In Stamatoyannopoulos G. Nienhuis A W. Leder P. Majerus P W (eds) The Molecular Basis of Blood Diseases WB Saunders. Philadelphia, pp 66-105)

Além da Hb A, existem cinco outras hemoglobinas humanas normais, cada uma das quais tem uma estrutura tetramérica comparável à da Hb A, consistindo em duas cadeias α ou similares a α e duas cadeias não-α (Fig. 11.2). Os genes para as cadeias α ou similares a α estão agrupados em uma disposição em tandem no cromossomo 16 e aqueles para as cadeias β ou similares a β estão no cromossomo 11. Existem dois genes idênticos de α-globina, chamados de α_1 e α_2, em cada cópia do cromossomo 16. Dentro do complexo gênico de β-globina, existe uma grande homologia entre os genes diferentes. Por exemplo, as globinas β e δ diferem em apenas 10 de seus 146 aminoácidos. Todos os genes de globina indubitavelmente surgiram de um gene ancestral comum.

Características da Estrutura da Globina Relevantes para as Hemoglobinopatias. As principais características da estrutura da globina foram altamente conservadas durante a evolução e são fundamentais para a compreensão das hemoglobinopatias. Acima de tudo, a estrutura terciária do polipeptídeo de globina foi preservada, de modo que absolutamente todas as globinas examinadas têm sete ou oito regiões helicoidais (dependendo da cadeia), chamadas de A até H na Fig. 11.3. Apenas dois aminoácidos foram conservados em todas as globinas da natureza, e mutações em um deles estão associadas à doença (ver Fig. 11.3).

O estudo da estrutura da hemoglobina permite que possamos prever que tipos de mutações provavelmente são patogênicas. Assim, uma mutação que altera a conformação da globina, substitui aminoácidos altamente conservados ou perturba a capa hidrofóbica — que elimina água do interior da molécula — pela substituição de um dos aminoácidos não-polares provavelmente causa uma hemoglobinopatia. Como todas as proteínas, a globina tem "áreas sensíveis", nas quais as mutações não podem ocorrer sem afetar o funcionamento, e "áreas insensíveis", nas quais a variação é tolerada com mais liberdade.

Expressão Desenvolvimental de Genes de Globina e Mudança de Hemoglobina

A mudança na expressão dos vários genes de globina durante o desenvolvimento (Fig. 11.4) (também chamada de **mudança de globina**) é um exemplo clássico da regulação ordenada da expressão gênica desenvolvimental (ver Cap. 17). Note que os ge-

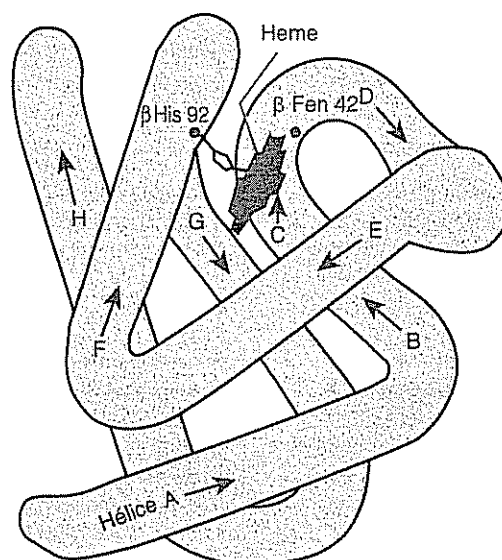



Fig. 11.3 Estrutura terciária de uma molécula de hemoglobina A molécula tem oito regiões helicoidais, chamadas de A a H. Os dois aminoácidos mais conservados são mostrados em His 92, a histidina à qual o ferro de heme está covalentemente ligado, e em Fen 42, a fenilalanina que apóia o anel de porfirina de hemo na "bolsa" da proteína dobrada. Ver discussão da Hb Hammersmith e da Hb Hyde Park, que têm substituições de Fen 42 e His 92, respectivamente.

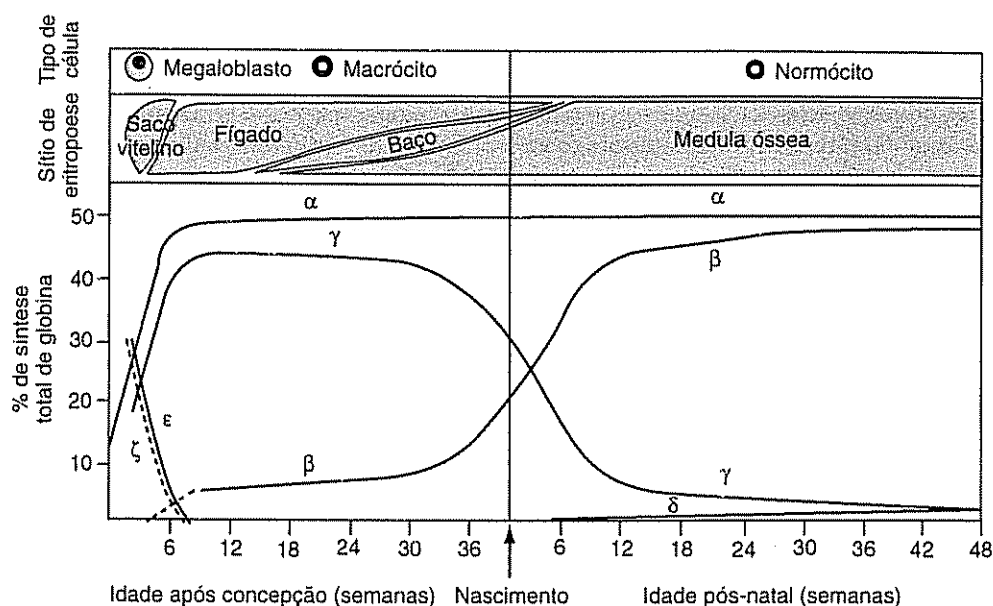



Fig. 11.4 Desenvolvimento da eritropoese no feto humano e na criança. Tipos de células responsáveis pela síntese de hemoglobina, órgão(s) envolvido(s) e tipos de cadeia de globina sintetizadas em estágios sucessivos. (Redesenhado de Wood W. G. [1976] Haemoglobin synthesis during fetal development. Br Med Bull 32:282-287, com permissão.)

nes nos grupamentos α e β são dispostos na mesma orientação transcricional e que, notadamente, os genes em cada grupo estão situados na mesma ordem seqüencial na qual são expressos durante o desenvolvimento. Há uma produção equimolar de cadeias de globina similares a α e a β.

Curiosamente, as mudanças temporais de síntese de globina são acompanhadas de mudanças no sítio principal de eritropoese (ver Fig. 11.4). A síntese de globina embrionária ocorre no saco vitelino da terceira à oitava semana de gestação, mas por volta da quinta semana de gestação o sítio principal de hematopoese começa a se mover do saco vitelino para o fígado fetal. A Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) é a hemoglobina predominante durante a vida fetal e constitui cerca de 70% da hemoglobina total ao nascimento, mas durante a vida a Hb F representa menos de 1% da hemoglobina total.

Embora as cadeias β possam ser detectadas no início da gestação, sua síntese torna-se significativa apenas perto no nascimento. Aos 3 meses de idade, quase toda a hemoglobina presente é do tipo adulto, a Hb A. A síntese de cadeias δ também continua após o nascimento, mas a Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) nunca contribui com mais que 2% da hemoglobina adulta. Alguns dos fatores de transcrição que controlam a expressão desenvolvimental dos genes de globina são conhecidos. O mecanismo de regulação da produção de cadeias de globina é de potencial importância terapêutica na talassemia (ver Cap. 13).

A Região Controladora do Locus de β-Globina. A expressão do gene de β-globina é apenas parcialmente controlada pelo promotor e pelos dois acentuadores no DNA imediatamente flanqueador (ver Cap. 3). A existência de elementos reguladores adicionais foi sugerida a princípio pela identificação de um grupo único de pacientes que não tinham expressão gênica de *nenhum* dos genes no grupo de β-globina, muito embora os próprios genes (incluindo seus elementos reguladores individuais) estivessem intatos. Descobriu-se que estes pacientes tinham grandes deleções anteriores ao complexo de β-globina, deleções que removeram um domínio de aproximadamente 20 kb, chamado de **região controladora de locus** (LCR), situado 20 kb "antes" do gene de ε-globina. A doença resultante, a $\varepsilon\gamma\delta\beta$-talassemia (Fig. 11.5), será descrita mais adiante. A LCR é necessária para a expressão de todos os genes de β-globina.

A LCR é responsável tanto pelo alto nível de expressão dos genes dentro do grupo quanto pela época desenvolvimental cor-

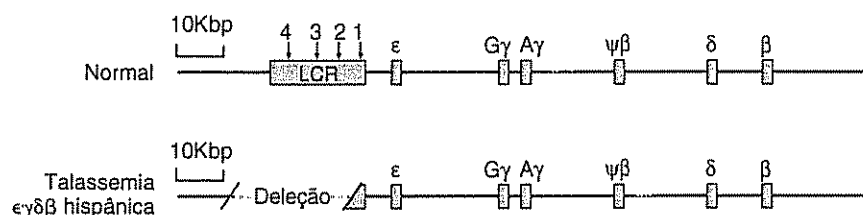



Fig. 11.5 A região de controle do locus de β-globina (LCR). Cada uma das quatro regiões da cromatina aberta (*setas*) contém vários sítios de consenso de ligação tanto para fatores de transcrição especificamente eritróides quanto ubíquos. Não estão claros os mecanismos exatos pelos quais a LCR regula a expressão gênica. É também mostrada uma deleção da LCR que levou à $\varepsilon\gamma\delta\beta$-talassemia, que é discutida no texto. (Redesenhado de Kazazian H.H. Jr., Antonarakis S. [1997] Molecular genetics of the globin genes. *In* Singer M., Berg P. (eds) Exploring Genetic Mechanisms. University Science Books, Sausalito, California, pp. 301-336.)

reta da expressão de cada gene. O controle da expressão gênica no grupo de β-globina pela LCR é obtido por dois mecanismos. Primeiro, a LCR fornece um domínio aberto de cromatina que dá acesso aos fatores de transcrição para os elementos reguladores dentro do grupo. Segundo, atua como um "superacentuador" de transcrição dos genes no grupo. Uma LCR também foi identificada para o locus de α-globina. Esta LCR está situada a cerca de 40 kb antes do gene de ξ-globina.

O significado clínico da LCR é triplo. Primeiro, como mencionado, os pacientes que têm deleções de LCR não expressam os genes do grupo de β-globina. Segundo, e de significado mais amplo, os componentes da LCR provavelmente são essenciais para a terapia gênica dos distúrbios do grupo de β-globina (ver Cap. 13). Terceiro, o conhecimento dos mecanismos moleculares subjacentes à mudança de globina podem tornar factível, por exemplo, acentuar a expressão do gene de γ-globina em pacientes com β-talassemia, que têm uma expressão gravemente prejudicada de β-globina. Tal acentuação seria um tratamento efetivo para a β-talassemia, porque a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) é um transportador efetivo de oxigênio no adulto (ver Cap. 13).

Dosagem Gênica, Ontogenia e Doença Clínica. As diferenças de dosagem gênica (de genes de quatro α e dois de β-globina por genoma diplóide) e a ontogenia das globinas α e β são importantes na compreensão da patogenia de muitas hemoglobinopatias. As mutações no gene de β-globina mais provavelmente causam doença em função de uma única mutação que afeta 50% das cadeias β, enquanto uma única mutação de cadeia α afeta apenas 25% das cadeias α. Por outro lado, as mutações de β-globina não têm conseqüências pré-natais, pois a γ-globina é a principal globina similar a β antes do nascimento, e a Hb F constitui três quartos da hemoglobina total a termo. Como as cadeias α são os únicos componentes de todas as globinas 6 semanas após a concepção (ver Fig. 11.4), as mutações em α-globina causam uma grave doença tanto na vida fetal quanto pós-natal.

DISTÚRBIOS GENÉTICOS DA HEMOGLOBINA

Os distúrbios hereditários da hemoglobina podem ser separados em três grupos amplos, dependendo de se a mutação altera a proteína globina, sua síntese ou a mudança desenvolvimental de globina:

1. **Variantes estruturais** que alteram o polipeptídeo de globina sem afetar sua taxa de síntese.
2. **Talassemias**, nas quais há uma síntese diminuída (ou, raramente, extrema instabilidade) de uma ou mais cadeias de globina, resultando no desequilíbrio das quantidades relativas das cadeias α e β.
3. **Persistência hereditária de hemoglobina fetal**, um grupo de condições clinicamente benignas que são de interesse porque prejudicam a mudança perinatal de síntese de γ para β-globina.

Variantes Estruturais de Hemoglobina

A maioria das hemoglobinas variantes resulta de mutações de ponto em um dos genes estruturais de globina, mas algumas são formadas por outros mecanismos moleculares mais complexos. Mais de 400 hemoglobinas anormais já foram descritas, e cerca de metade delas é clinicamente significativa. As variantes estruturais da hemoglobina podem ser separadas em três classes (Quadro 11.2), dependendo do fenótipo clínico.

1. Variantes que causam **anemia hemolítica**. A grande maioria das hemoglobinas mutantes que causam anemia hemolítica torna instável o tetrâmero de hemoglobina. Entretanto, duas das variantes mais bem conhecidas associadas à hemólise, a globina falciforme e a Hb C, não são instáveis, mas fazem com que as globinas mutantes adquiram estruturas incomuns rígidas.
2. Mutantes com **transporte de oxigênio alterado**, devido ao aumento ou à diminuição de afinidade com o oxigênio ou à formação de metemoglobina, uma forma de globina incapaz de oxigenação reversível.
3. Variantes decorrentes de mutações na região codificante que causam **talassemia** porque reduzem a abundância do polipeptídeo globina. A maioria destas mutações prejudica a taxa de síntese do mRNA ou da proteína. Algumas variantes raras causam grande instabilidade do monômero de hemoglobina, maior instabilidade que as variantes associadas à anemia hemolítica.

Os mutantes estruturais descritos neste capítulo (ver Quadro 11 2) são apresentados ou porque são comuns e representativos de um dos três grupos descritos anteriormente, ou porque ilustram as acentuadas e variáveis conseqüências bioquímicas e clínicas das mutações, tanto substituições de um só nucleotídeo quanto de outros tipos de mudanças no DNA.

ANEMIAS HEMOLÍTICAS

Hemoglobinas com Novas Propriedades Físicas: Anemia Falciforme

A hemoglobina falciforme (Hb S) foi a primeira hemoglobina anormal a ser detectada e é de grande importância clínica. Deve-se a uma única substituição de nucleotídeos, que muda o códon do sexto aminoácido da β-globina de ácido glutâmico para valina (GAG $\rightarrow$ GTG: Glu6Val) (ver Quadro 11.2). A homozigose para esta mutação é a causa da **anemia falciforme**, um grave distúrbio que é comum em algumas partes do mundo. A doença tem uma distribuição geográfica característica, ocorrendo com mais freqüência na África equatorial e de modo menos comum na área do Mediterrâneo e da Índia e em países para os quais migraram pessoas destas regiões. Cerca de 1 em 600 afro-americanos nasce com esta doença, que pode ser fatal no início da infância, embora uma sobrevida mais longa esteja se tornando mais comum.

Características Clínicas. A anemia falciforme é uma condição hemolítica autossômica recessiva caracterizada por uma tendência das hemácias a tomar uma forma bastante anormal (foiciforme) sob condições de baixa tensão de oxigênio (ver Fig. 11.6). Os heterozigotos, que são ditos tendo o **traço falcêmico**, são clinicamente normais, mas suas hemácias afoiçam-se quando submetidas à pressão de oxigênio muito baixa *in vitro*. As ocasiões em que isto pode ocorrer *in vivo* são muito incomuns, embora os heterozigotos pareçam estar em risco de infarto esplênico, especialmente quando voando a grandes altitudes em aviões com pressurização reduzida da cabine. O estado heterozigoto está presente em cerca de 8% dos afro-americanos, mas em áreas onde a freqüência gênica é alta (p. ex., oeste da África Central) até 25% da população de neonatos é heterozigota.

QUADRO 11-2

As Principais Classes de Variantes Estruturais de Hemoglobina*

Classe Variante	Base Molecular da Mutação	Mudança de Polipeptídeo	Efeito Fisiopatológico da Mutação	Herança
***Variantes que causam anemia hemolítica* (1) Hemoglobinas com novas propriedades físicas**				
Hb S	Substituição de um só nucleotídeo	Cadeia β: Glu6Val	Hb S desoxigenada se polimeriza → células falcêmicas → oclusão vascular e hemólise	AR
Hb C	Substituição de um só nucleotídeo	Cadeia β: Glu6Lis	Hb C oxigenada tende a se cristalizar → células menos deformáveis → hemólise branda. A doença nos compostos Hb S/Hb C é como a anemia falciforme branda	AR
***Variantes que causam anemia hemolítica* (2) Hemoglobinas instáveis**				
Hb Hammersmith	Substituição de um só nucleotídeo	Cadeia β: Fen42Ser	Uma Hb instável → precipitação de hemoglobina → hemólise; também baixa afinidade com O_2	AD
Hb Gun Hill	Mau pareamento de seqüências homólogas e crossing desigual dentro do *mesmo* gene (*vs.* Hb Lepore e Hb Miyada, abaixo)	Cadeia β: uma deleção de 5 aminoácidos	Uma Hb instável, com aumento de afinidade com oxigênio	AD
Hemoglobinas com transporte alterado de O_2				
Hb Hyde Park (uma Hb M)	Substiuição de um só nucleotídeo	Cadeia β: His92Tir	A substituição torna o ferro do heme oxidado resistente à metemoglobina redutase → Hb M, que não transporta O_2 → cianose (assintomática)	AD
Hb Kempsey	Substituição de um só nucleotídeo	Cadeia β: Asp99Asn	A substituição mantém a Hb em sua estrutura de alta afinidade com O_2 → menos O_2 para os tecidos → policitemia	AD
Hb Kansas	Substituição de um só nucleotídeo	Cadeia β: Asn102Tre	A substituição mantém a Hb em sua estrutura de baixa afinidade com O_2 → cianose assintomática	AD
Hb Tak	Mudança de matriz perto da ponta da cadeia leva à continuação até o códon finalizador mais adiante na nova matriz	Cadeia β: 11 aminoácidos adicionais	Afinidade com oxigênio muito aumentada, em função da nova ponta C-terminal hidrofóbica que evita a formação de uma estrutura "desoxi" estável	AR
***Variantes com fenótipo de talassemia*†**				
Hb E	Substituição de um só nucleotídeo	Cadeia β: Glu26Lis	A mutação → uma Hb anormal *e* sem síntese diminuída (recomposição anormal do RNA) → talassemia branda (ver Fig. 11 14)	AR
Hb Lepore e Hb Miyada (uma Hb anti-Lepore)	Mau pareamento de seqüências homólogas e crossing desigual entre genes *diferentes* → deleção de 7 kb (Lepore) → inserção de 7 kb (Miyada) (ver Fig 11 10)	Hb Lepore: Uma cadeia de fusão δβ Hb Miyada: Uma cadeia de fusão $\beta\delta$	Ambas: síntese ineficiente de cadeia de fusão → grave $\delta\beta$-talassemia em homozigotos ou em compostos genéticos com alelos de β-talassemia	Ambas: AR
Hb Constant Spring	Substituição no códon finalizador: UAA ou UAG para CAA ou CAG → continua até o próximo códon finalizador na matriz	Cadeia α: 31 aminoácidos adicionais	Síntese prejudicada e instabilidade da cadeia α alongada → hemólise, α-talassemia em compostos genéticos com mutações de α-talassemia ($--/\alpha^{CS}\alpha$)	AR

*As variantes de hemoglobina são designadas pelo nome da cidade onde foi relatado o primeiro paciente. †Variantes estruturais adicionais de cadeia β que causam β-talassemia são mostradas no Quadro 11 4

Condição Clínica	Hemoglobina	Composição da Hemoglobina	Genótipo
Normal	Hb A	$\alpha_2^A\beta_2^A$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ β/β
Traço falcêmico	Hb A, Hb S	$\alpha_2^A\beta_2^A$ $\alpha_2^A\beta_2^S$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ β/β^S
Anemia falciforme	Hb S	$\alpha_2^A\beta_2^S$	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ β^S/β^S

A Patologia Molecular da Hb S. Em 1956, Ingram descobriu que a anomalia na hemoglobina falciforme era a substituição de um dos 146 aminoácidos na cadeia β da molécula de hemoglobina. Todas as manifestações clínicas da hemoglobina falciforme são conseqüências desta única mudança no gene de β-globina. Esta foi a primeira demonstração *em qualquer organismo* de que uma mutação em um gene estrutural podia causar uma substituição de aminoácido na proteína correspondente.

Como a anomalia da Hb S está situada na cadeia β, a fórmula para a hemoglobina falciforme pode ser escrita como $\alpha_2\beta_2^S$ ou, mais precisamente, como $\alpha_2^A\beta_2^S$ Um heterozigoto tem uma mistura dos dois tipos de hemoglobina, A e S. As relações entre a condição clínica, os tipos de hemoglobina e os genes podem ser resumidas do seguinte modo:

Afoiçamento e Suas Conseqüências. A patologia molecular e celular da doença falciforme está resumida na Fig. 11.6. As moléculas de hemoglobina contendo as subunidades mutantes de β-globina são normais no que diz respeito à habilidade para desempenhar sua função principal de ligação de oxigênio (desde que não sejam polimerizadas, como descrito em seguida), mas no sangue desoxigenado têm apenas um quinto da solubilidade da hemoglobina normal. A relativa insolubilidade da desoxiemoglobina S é a base física do fenômeno de afoiçamento. Sob condições de baixa tensão de oxigênio, as moléculas de hemoglobina falciforme agregam-se sob a forma de polímeros com formato de bastão ou fibras, que distorcem a forma do eritrócito para um aspecto foiciforme. Estes eritrócitos alterados são menos deformáveis que os normais e, ao contrário das hemácias normais, não podem se enfileirar através dos capilares, bloqueando, assim, o fluxo de sangue e causando uma isquemia local.

Múltiplas Origens da Mutação Hb S. Em um dos importantes usos de um marcador polimórfico do DNA para o estudo de pacientes genéticos e populações, Kan e Dozy mostraram, em 1978, que o gene normal de β-globina está contido dentro de um fragmento de restrição de 7,6 kb de DNA na maioria das pessoas de origem africana (Fig. 11.7). Em contraste, eles descobriram que o alelo de globina falcêmica é freqüentemente encontrado em um fragmento de 13 kb em algumas partes da África, tais como Gana (ver Fig. 11.7), e em quase 70% dos afro-americanos. Esta alta freqüência de portadores permitiu que o fragmento de 13 kb fosse usado como um marcador de anemia falciforme nestes grupos. Em outras partes da África (p. ex., Quênia), a mutação falciforme é tipicamente associada ao fragmento de 7,6 kb (ver Fig. 11.7). Estes achados implicam que a mutação falciforme surgiu no oeste da África em um cromossomo que continha o gene de β-globina no fragmento de 13 kb e que ele ocorria independentemente pelo menos uma vez em outra parte. A proteção que o gene falciforme confere contra a malária nos heterozigotos contribui para a alta freqüência que o gene atingiu em áreas de malária no mundo (ver Cap. 7).

Hemoglobinas com Propriedades Físicas Novas: Hemoglobina C

A Hb C foi a segunda variante de hemoglobina a ser identificada e, coincidentemente, assim como a Hb S, ela também se deve a uma substituição na sexta posição da cadeia β, sendo o ácido glutâmico substituído por lisina (Glu6Lis) (ver Quadro 11.2). A Hb C é menos solúvel que a Hb A e, portanto, tende a se cristalizar nas hemácias, o que reduz sua deformabilidade nos capilares e causa um distúrbio hemolítico brando.

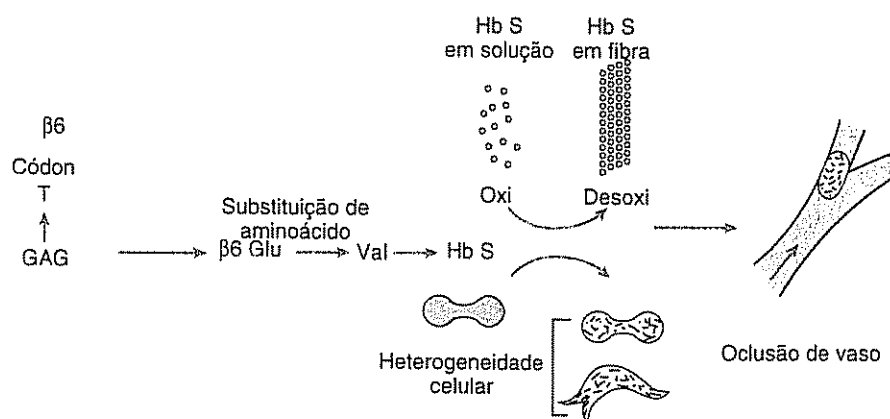



Fig. 11.6 Esquema da patogenia da anemia falciforme (Redesenhado de Ingram V. [1986] Sickle cell disease: molecular and cellular pathogenesis. *In* Bunn H. F., Forget B. G. [eds] Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. WB Saunders, Philadelphia, pp: 453-501.)

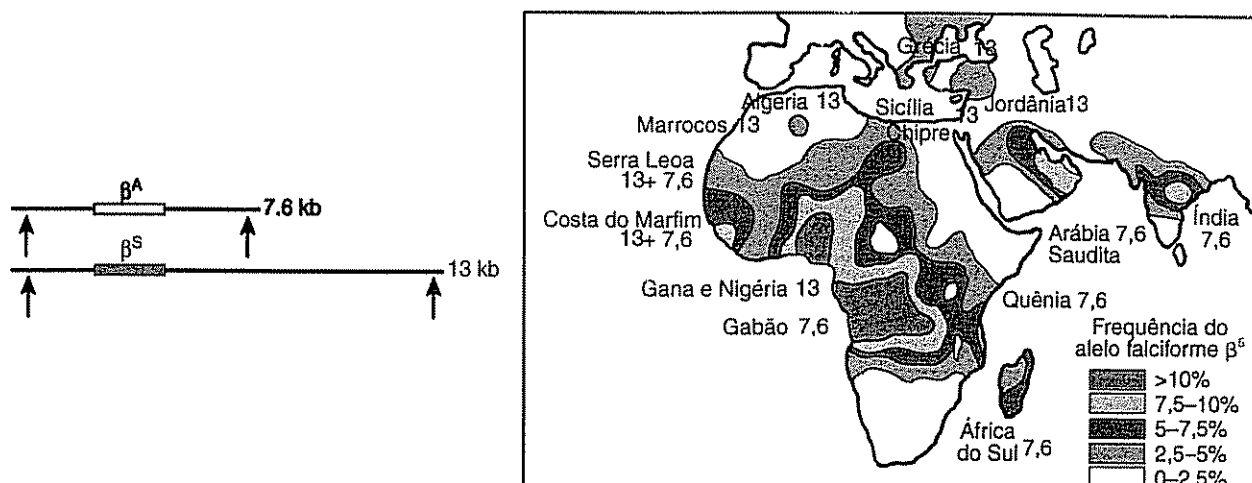



Fig. 11.7 O polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição de *Hpa*I adjacente ao gene β^S e a distribuição geográfica do gene da anemia falciforme em relação aos fragmentos de *Hpa*I com 7,6 kb e 13 kb de tamanho. A mutação associada ao fragmento de 13 kb originada no oeste da África e disperso a partir daí. A mutação associada ao fragmento de 7,6 kb surgiu separadamente e é provável que tenha tido múltiplas origens. (De Kan Y. W. [1978] *In* The Harvey Lectures, Series 76, Academic Press, New York, pp. 75-93, com permissão.)

O alelo β^C é freqüente no oeste da África e nos descendentes de pessoas desta região (cerca de 1% dos afro-americanos são portadores). Assim, não é raro encontrar pessoas com Hb C que têm o alelo β^S ou o alelo de talassemia no outro locus de β-globina. As pessoas que são **compostos genéticos** para as mutações β^C e β^S (doença Hb SC) têm um distúrbio hemolítico que é mais brando que a anemia falciforme e podem não ter problemas clínicos até que, inesperadamente, se desenvolva uma grave complicação em conseqüência de oclusão vascular, em particular na retina.

Hemoglobinas Instáveis

Hb Hammersmith. As hemoglobinas instáveis em geral se devem a mutações de ponto que causam desnaturação do *tetrâmero* de hemoglobina. (Note que a instabilidade é muito menos pronunciada que nas variantes raras que desestabilizam o *monômero* de globina de modo a causar desequilíbrio e talassemia.) Os tetrâmeros de globina desnaturados são insolúveis e precipitam-se para formar inclusões (corpos de Heinz) que contribuem para danificar a membrana das hemácias e causar hemólise. A substituição de aminoácidos na Hb Hammersmith (cadeia β:Fen42Ser) (ver Quadro 11.2) é particularmente notável porque a fenilalanina substituída (ver Fig. 11.3) é um dos dois aminoácidos que são conservados em todas as globinas. Portanto, não é surpreendente que as substituições nesta posição produzam uma grave doença. O papel da fenilalanina é alojar o heme em seu lugar na β-globina. Sua substituição por serina, um aminoácido menor que deixa um espaço, permite que o heme saia de seu local. Além de sua instabilidade, a Hb Hammersmith tem uma baixa afinidade com o oxigênio, o que causa cianose.

Hb Gun Hill. A maioria das variações de hemoglobina é causada por substituições de um único nucleotídeo, mas outros tipos de anomalias moleculares, tais como pequenas deleções, foram reconhecidas. O mecanismo tido como subjacente a maioria das deleções, chamado de **mau pareamento**, é ilustrado pela Hb Gun Hill. O alelo da Hb Gun Hill tem uma deleção de 15 pares de bases no gene de β-globina. A abertura da matriz de leitura de β-globina é mantida, mas cinco aminoácidos são removidos do polipeptídeo. A cadeia β mutante é capaz de se dobrar, mas o tetrâmero de Hb Gun Hill é instável (ver Quadro 11.2), levando à hemólise. Observou-se que pequenas deleções ocorrem de maneira mais comum em sítios nos quais estão presentes seqüências com repetições diretas no DNA. O mecanismo de mau pareamento pelo qual a presença de tais repetições é tido como a causa de uma deleção é destacado na Fig. 11.8 (em cima). A região deletada de 15 pares de bases da Hb Gun Hill é flanqueada por duas seqüências repetidas quase idênticas que estão na região dos códons de 90 a 98 do gene de β-globina (ver Fig. 11.8, embaixo).

Variantes com Transporte Alterado de Oxigênio

As mutações que alteram a habilidade da hemoglobina para transportar oxigênio, embora raras, são de interesse geral, pois ilustram como uma mutação pode prejudicar um conjunto de funções de uma proteína (neste caso, ligação de oxigênio e liberação) que é de responsabilidade de um domínio, deixando relativamente intatas as outras propriedades da molécula. Por exemplo, as mutações que serão descritas em geral têm pouco ou nenhum efeito na estabilidade da hemoglobina.

Metemoglobinas

A oxiemoglobina é a forma de hemoglobina que é capaz de oxigenação reversível; o ferro do heme está no estado reduzido (ou ferroso). O ferro do heme tende a oxidar-se espontaneamente na forma férrica, e a molécula resultante, chamada de metemoglobina, é incapaz de oxigenação reversível. Caso quantidades significativas de metemoglobina acumulem-se no sangue, ocorre cianose. A manutenção do ferro do heme no estado reduzido é o papel da enzima metemoglobina redutase. Em várias globinas mutantes (sejam α ou β), as substituições na região da bolsa do heme afetam a ligação heme-globina de tal modo que tornam o ferro resistente à redutase. Embora os heterozigotos para estas hemoglobinas mutantes sejam cianóticos, eles são assintomáticos. O estado homozigoto é supostamente letal. Um exemplo de uma metemo-

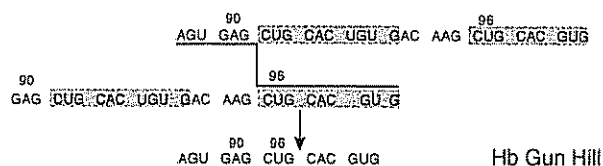
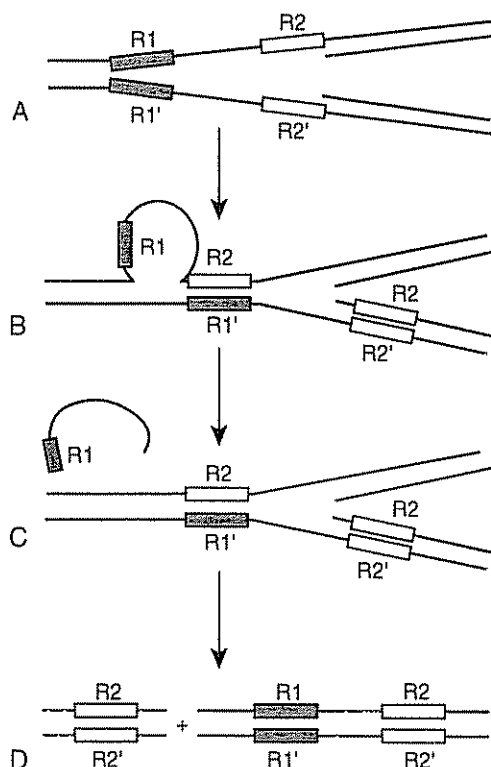



Fig. 11.8 (*Em cima*) O mecanismo de mau pareamento (*slipped*) tido como subjacente a maioria das pequenas deleções, tais como a Hb Gun Hill (A) Um duplo filamento de DNA, contendo as duas seqüências R1 e R2 de repetições diretas, torna-se unifilamentar na forquilha de replicação (B) A repetição R2 faz um mau pareamento com a repetição complementar R1, que fica em uma alça com sua seqüência adjacente (C) Após a eliminação da alça unifilamentar, o filamento de DNA é reparado (D) Os dúplices filhos, um dos quais tem apenas uma repetição e ausência da seqüência entre as repetições (Redesenhado de Cooper D N, Krawczak M (1993) Human Gene Mutation, BIOS Scientific Publishers, Oxford) (*Embaixo*) a Hb Gun Hill é uma variante estrutural de cadeia β com uma deleção dos códons 91-95 Esta deleção provavelmente surgiu pelo mecanismo de mau pareamento mostrado acima As duas repetições flanqueadoras e seu mau pareamento são mostrados, juntamente com a seqüência do alelo da Hb Gun Hill

globina de uma cadeia β é a Hb Hyde Park, na qual a histidina conservada (ver His92 na Fig. 11.3) à qual o heme se liga covalentemente foi substituída por tirosina (His92Tir).

Hemoglobinas com Afinidade Alterada pelo Oxigênio

Hemoglobinas Kempsey e Kansas. As mutações que alteram a afinidade com o oxigênio são significativas porque demonstram a importância da interação da subunidade no funcionamento normal de uma proteína multimérica tal como a hemoglobina. No tetrâmero de Hb A, as cadeias são dispostas como mostra a Fig. 11.9.

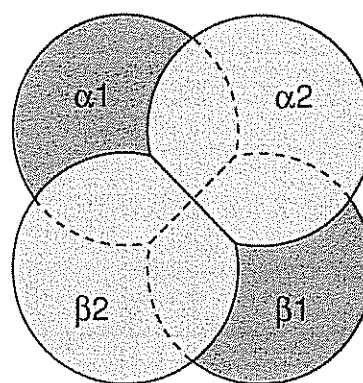



Fig. 11.9 Representação de uma molécula de hemoglobina adulta normal (Hb A) Existem duas cadeias α e duas β, cada uma associada a uma fração heme À medida que a hemoglobina muda do estado oxigenado para o desoxigenado, ocorre um movimento crítico das cadeias nos contatos α_1:β_2 As substituições nas interfaces das subunidades podem alterar a afinidade com o oxigênio (p. ex., Hb Kempsey e Hb Kansas, ver o texto) ou a estabilidade da molécula

A interface α_1:β_2 foi altamente conservada durante a evolução porque está sujeita a um significativo movimento entre as cadeias quando a hemoglobina muda da forma oxigenada (relaxada) para a desoxigenada (tensa) da molécula. Previsivelmente, as substituições de aminoácidos nesta interface, exemplificadas pelos mutantes de β-globina Hb Kempsey e Hb Kansas, têm graves efeitos patológicos, pois evitam o movimento relacionado ao oxigênio entre as cadeias. Entretanto, estas duas proteínas mutantes têm anomalias estruturais e clínicas, que são o inverso uma da outra. Na Hb Kempsey (cadeia β Asp99Asn), a mutação "tranca" a hemoglobina na estrutura relaxada, que tem alta afinidade com o oxigênio, e causa policitemia. Os portadores da Hb Kansas (cadeia β Asn102Tre), por outro lado, têm cianose, pois a mutação inibe a formação da estrutura relaxada (oxigenada), de modo que a hemoglobina tem sua afinidade com o oxigênio diminuída. Entretanto, pelo menos um portador de Hb Kansas é suficientemente saudável para ser um excelente tenista, o que sugere que ele pode obter uma fração de oxigênio maior que a normal do sangue

Hb Tak. A afinidade aumentada com o oxigênio da Hb Tak (ver Quadro 11.2) é o resultado de uma pequena inserção (dois pares de bases) entre os códons 146 e 147 da cadeia β. Esta mutação ilustra um princípio diferente — de que as inserções ou deleções na matriz de leitura de um gene que não são múltiplos de 3 mudarão a matriz de leitura alterando o tamanho do polipeptídeo Como o códon 146 é o último códon de aminoácido antes do finalizador de β-globina (ver Fig. 3.10), o efeito da inserção de dois pares de bases é aumentar o tamanho da cadeia β em 11 aminoácidos, uma alteração que aumenta a afinidade da proteína com o oxigênio (ver Quadro 11.2).

HEMOGLOBINAS VARIANTES COM FENÓTIPOS DE TALASSEMIA

Hemoglobina E: Um Polipeptídeo Anormal de Beta-Globina com Síntese Reduzida de mRNA

A Hb E é uma variante estrutural de β-globina (Glu26Lis) que causa talassemia porque é sintetizada a uma taxa reduzida. É provável que seja a hemoglobina estruturalmente anormal mais comum no mundo, ocorrendo em alta freqüência no sudeste da

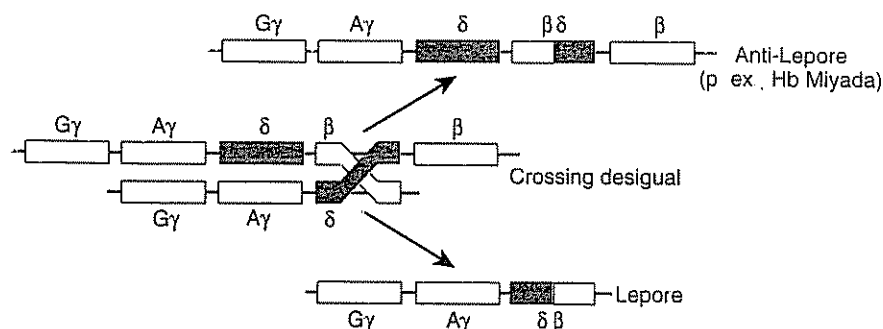



Fig. 11.10 Modelo da origem de um gene Lepore e de um gene anti-Lepore, tal como a Hb Miyada, por crossing desigual. Os genes adjacentes γ e β diferem em apenas 10 de seus 146 aminoácidos. Se ocorrer um mau pareamento, seguido de crossing intragênico, resultarão dois genes híbridos: um com uma deleção de parte de cada locus (um gene Lepore) e o outro com uma duplicação correspondente (um gene anti-Lepore, tal como o que codifica a Hb Miyada). (Redesenhado de Weatherall D J, Clegg J B [1981] The Thalassemia Syndromes, 3.ª ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.)

Ásia, onde há pelo menos 1 milhão de homozigotos e 30 milhões de heterozigotos. Este alelo é notável por vários motivos: sua freqüência, sua interação alélica com outros mutantes de β-globina e seu efeito na recomposição do RNA (ver Quadro 11.2). Embora os homozigotos para a Hb E sejam assintomáticos e apenas levemente anêmicos, os compostos genéticos com a mutação Hb E e diferentes alelos de β-talassemia têm fenótipos anormais, que são amplamente determinados pela gravidade do outro alelo. A Hb E também é notável devido à sua mutação, que, embora situada na região codificante, reduz a recomposição normal do RNA de β^E-globina, produzindo um fenótipo de talassemia branda. O mecanismo pelo qual esta mutação prejudica a recomposição será revisto na discussão sobre β-talassemia, mais adiante.

Hemoglobinas Lepore e Anti-Lepore: Genes de Fusão

Alguns pacientes com β-talassemia de moderada a grave têm uma cadeia incomum não-α que consiste em uma metade N-terminal (50 a 80 aminoácidos) de uma cadeia δ normal fusionada a uma metade C terminal (60 a 90 aminoácidos) de uma cadeia β normal, para formar uma nova cadeia de fusão $\delta\beta$, chamada de Hb Lepore (ver Quadro 11.2). Esta variante surgiu por crossing homólogo, mas desigual, entre os genes muito similares de δ-globina e β-globina (Fig. 11.10). Durante a meiose, o desalinhamento baseado na homologia de seqüência entre o gene δ de uma cromátide e o gene β da cromátide correspondente pode acontecer, como um acidente relativamente raro. O crossing over entre as cromátides seria então possível, formando dois produtos anormais, um gene de fusão deletado, tal como a Hb Lepore, e um gene de fusão "anti-Lepore" com uma inserção, sendo um exemplo a Hb Miyada (ver Fig. 11.10 e Quadro 11.2). Note que este mecanismo de detecção difere do mecanismo de mau pareamento que é tido como o responsável por pequenas deleções, tais como a deleção na Hb Gun Hill (ver Fig. 11.8).

Talassemia: Um Desequilíbrio de Síntese de Cadeias de Globina

As talassemias, que em termos coletivos constituem os distúrbios monogênicos humanos mais comuns, são um grupo heterogêneo de doenças da síntese de hemoglobina no qual as mutações reduzem a síntese ou a estabilidade de cadeias α ou β, causando a **α- ou a β-talassemia**, respectivamente. O desequilíbrio resultante na proporção de cadeias α:β é subjacente à fisiopatologia. A cadeia que é produzida na taxa normal está em relativo excesso. Na ausência de uma cadeia complementar com a qual formar um tetrâmero, o excesso de cadeias normais precipita-se na célula, danificando a membrana e levando à destruição prematura das hemácias. Além disso, o defeito na síntese de hemoglobina produz uma anemia hipocrômica, microcítica.

O nome "talassemia" é derivado da palavra grega para mar, *thalassa*, e significa que a doença foi inicialmente descoberta em pessoas de origem mediterrânea. Tanto a talassemia α quanto a β, entretanto, têm uma alta freqüência em muitas populações, embora a α-talassemia seja mais prevalente e amplamente distribuída. A freqüência de talassemia deve-se à vantagem protetora contra a malária que é conferida aos portadores, análoga à vantagem dos heterozigotos (ver Cap. 7) dos portadores de hemoglobina falciforme. Há uma distribuição característica da talassemia em uma faixa ao redor do Velho Mundo no Mediterrâneo, Oriente Médio e partes da África, Índia e Ásia. Na maioria dos países, os portadores de talassemia são suficientemente numerosos para criar um problema importante de diagnóstico diferencial da anemia por deficiência de ferro e ser uma fonte relativamente comum de referência para a detecção de homozigotos e diagnóstico pré-natal.

Uma consideração clínica importante é que *não* é raro que alelos de ambos os tipos de talassemia, bem como para anomalias estruturais de hemoglobina, coexistam em uma pessoa. Em conseqüência, podem ocorrer interações clinicamente importantes entre alelos diferentes do mesmo gene ou entre alelos mutantes de genes diferentes de globina. Estas interações estão destacadas no boxe ao final deste capítulo.

As Alfa-talassemias

Os distúrbios genéticos de produção de α-globina afetam *tanto* a formação de hemoglobina fetal quanto adulta (ver Figs. 11.2 e 11.4) e causam, portanto, doenças intra-uterinas e pós-natais. Na ausência de cadeias de α-globina com as quais se associar, as cadeias de β-globina ficam livres para formar hemoglobina homotetramérica. A hemoglobina com a composição γ_4 é conhecida como Hb Bart, e o tetrâmero β_4 é chamado de Hb H. Como nenhuma destas hemoglobinas é capaz de liberar oxigênio para os tecidos em condições normais, elas são totalmente ineficazes como transportadoras de oxigênio. Em conseqüência, as crianças com α-talassemia grave e altos níveis de Hb Bart sofrem uma

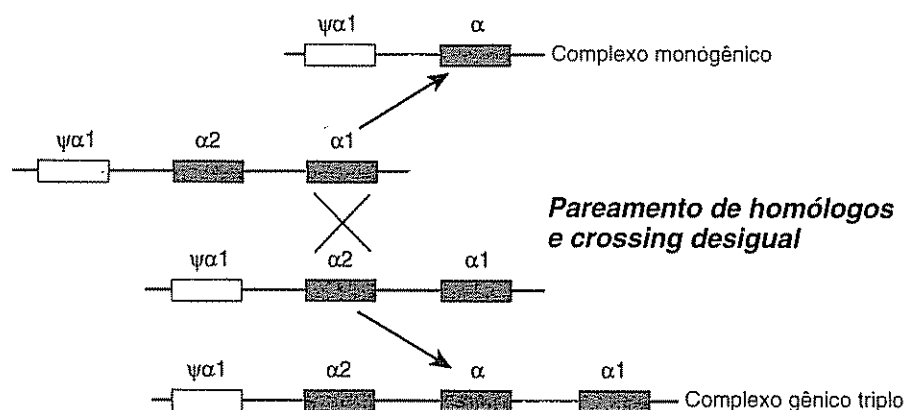



Fig. 11.11 O provável mecanismo da forma mais comum de α-talassemia, que se deve a deleções de um dos dois genes de α-globina em um cromossomo. O desalinhamento, o pareamento homólogo e a recombinação entre o gene α_1 de um cromossomo e o gene α_2 no cromossomo homólogo resulta na deleção de um gene α (Redesenhado de Orkin S H. [1987] Disorders of hemoglobin synthesis: The thalassemias. *In* Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A W., Leder P., Majerus P W [eds] The Molecular Basis of Blood Diseases. WB Saunders, Philadelphia. pp 106-126.)

grave hipóxia intra-uterina e nascem com intenso acúmulo generalizado de líquido, uma condição chamada de **hidropisia fetal**. Nas α-talassemias brandas, desenvolve-se uma anemia devido à precipitação gradual de Hb H no eritrócito. Isto leva à formação de inclusões na hemácia madura, e a remoção destas inclusões pelo fígado danifica as células, levando à sua destruição prematura.

Deleção dos Genes de Alfa-Globina. As formas mais comuns de α-talassemia são o resultado de deleções. O motivo para a freqüência deste tipo de anomalia nos mutantes de cadeia α e não β é revelado pela comparação destes genes e seus contextos cromossômicos locais (ver Fig. 11.2). Não só existem dois genes α idênticos em cada cromossomo16, mas as seqüências íntron ao redor de dois genes α também são muito similares.

A disposição das regiões de homologia em tandem nos genes α e ao redor deles facilita o desalinhamento devido ao pareamento homólogo e à subseqüente recombinação entre o domínio do gene α_1 em um cromossomo e a região correspondente do gene α_2 no outro (Fig. 11.11). A evidência de que esta explicação para as deleções é correta é dada pelos relatos de raras pessoas normais com um complexo triplicado de genes α (ver Fig. 11.11). As deleções ou outras alterações de um, dois, três ou todos os quatro destes genes causam uma anomalia hematológica grave correspondente, como resumido no Quadro 11.3.

Embora as α-talassemias sejam distribuídas por todo o mundo, o tipo de deleção homozigota de α-talassemia que leva à hidropisia fetal é muito restrita ao sudeste da Ásia. A alta freqüência gênica nesta população (de até 15% em algumas regiões) pode ser explicada pela natureza da deleção. O estado heterozigoto, chamado de traço de α-talassemia (dois genes α normais e dois mutantes), pode resultar de um dos dois genótipos ($-\alpha/-\alpha$ ou $--/\alpha\alpha$). Este último é relativamente comum no sudeste da Ásia, e a prole, conseqüentemente, pode receber dois cromossomos ($--/--$). Em outros grupos, entretanto, a heterozigose em geral é o resultado do genótipo ($-\alpha/-\alpha$), do qual não há qualquer possibilidade de transmissão do fenótipo da hidropisia fetal.

Além das mutações de α-talassemia que resultam em deleção dos genes α em si, viu-se que as mutações que deletam apenas a LCR do complexo de α-globina (ver Fig. 11.2) também causam α-talassemia. De fato, tais mutações indicaram primeiro a existência deste elemento regulador.

Formas Não-deleção de Alfa-talassemia. Sua ocorrência é menos comum que os genótipos de deleção descritos. Quatro mutações de término de cadeia α, incluindo a variante estrutural Hb Constant Spring (ver Quadro 11.2), causam α-talassemia, aparentemente em função de uma pronunciada instabilidade da cadeia mutante de α-globina.

QUADRO 11-3

Condições Clínicas dos Genótipos de Alfa-talassemia

Condição Clínica	Número de Genes Funcionais	Genótipo	Produção de Cadeia α
Normal	4	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	100%
Portador silencioso	3	$\alpha\alpha/\alpha-$	75%
Traço de α-talassemia (anemia branda, microcitose)	2	$\alpha-/\alpha-$ ou $\alpha\alpha/--$	50%
Doença da Hb H (β4) (anemia hemolítica moderadamente grave)	1	$\alpha-/--$	25%
Hidropisia fetal ou α-talassemia homozigota (Hb Bart's: γ4)	0	$--/--$	0%

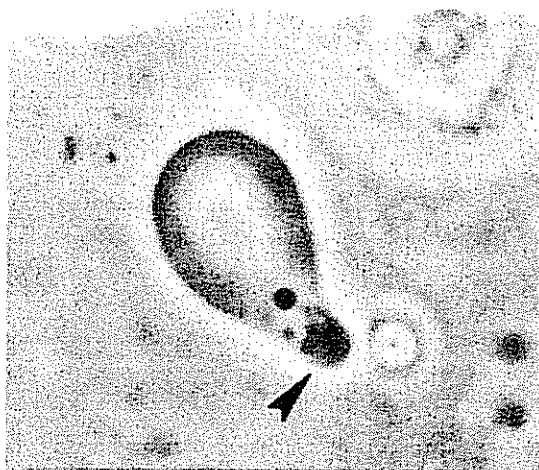



Fig. 11.12 Visualização de um efeito patológico da deficiência de cadeias β na β-talassemia. A precipitação do excesso de cadeias α normais forma um corpo de Heinz na hemácia. Microscopia de fase de uma preparação de amostra de baço de um paciente com β-talassemia homozigota mostrando uma inclusão de cadeia α (*seta*) dentro de uma hemácia em forma de gota. Tais inclusões são removidas do eritrócito pelas células reticuloendoteliais, danificando a membrana celular e causando a destruição prematura da célula. (De Nathan D G [1972] Thalassemia. N Engl J Med 286:586-594, por permissão.)

As Beta-talassemias

As β-talassemias compartilham muitas características com as α-talassemias. A produção diminuída de β-globina causa uma anemia hipocrômica, microcítica, e o desequilíbrio da síntese de globina leva à precipitação do excesso de cadeias α, o que, por sua vez, leva a danos na membrana das hemácias. Em contraste com a α-globina, entretanto, a cadeia β é importante apenas no período pós-natal (ver Fig. 11.4). Em conseqüência, o início da β-talassemia não é aparente até alguns meses após o nascimento, quando a β-globina normalmente substitui a γ-globina como a principal cadeia não-α, e apenas a síntese da principal hemoglobina do adulto, a Hb A, é reduzida. O excesso de cadeias α é insolúvel, de modo que elas se precipitam nos precursores de hemácias e são destruídas na medula óssea. Este processo causa uma eritropoese ineficiente (Fig. 11.12). Como o gene δ fica intato, a produção de Hb A_2 continua e, de fato, a elevação do nível de Hb A_2 é único para os heterozigotos de β-talassemia. O nível de Hb F também está aumentado, não em função de uma reativação da expressão do gene de γ-globina que foi desligado ao nascimento, mas sim de uma sobrevida seletiva e talvez também de uma produção aumentada da população menor de hemácias adultas que contêm Hb F.

Em contraste com a α-talassemia, as β-talassemias em geral são decorrentes de uma única substituição de par de bases em vez de deleções. Existem tantas mutações diferentes de β-talassemia que é mais provável que as pessoas portadoras de dois alelos de β-talassemia sejam compostos genéticos que verdadeiros homozigotos para um alelo. A maioria das pessoas com dois alelos de β-talassemia tem **talassemia major**, uma condição caracterizada por grave anemia, e precisam de tratamento médico por toda a vida. Quando os alelos de β-talassemia produzem tão pouca β-globina que nenhuma Hb A está presente, a condição é designada **talassemia β^0**. Quando alguma Hb A é detectada, diz-se que o paciente tem **talassemia β^+**. Embora a gravidade clínica da doença dependa do efeito combinado dos dois alelos presentes, até recentemente a sobrevida até a idade adulta era incomum.

As crianças afetadas por β-talassemia homozigota apresentam-se com anemia quando a produção pós-natal de Hb F diminui, em geral antes dos 2 anos de idade. As hemácias no sangue periférico são todas acentuadamente hipocrômicas e variáveis em forma e tamanho. No momento, o tratamento das talassemias baseia-se na correção da anemia, no aumento de expansão da medula óssea por transfusão de sangue e no controle do conseqüente acúmulo de ferro pela administração de agentes quelantes. O transplante de medula óssea é efetivo, mas é uma opção apenas quando se pode encontrar um membro da família compatível em HLA. As terapia experimentais são promissoras e serão discutidas no Cap. 13.

Os portadores de um alelo de β-talassemia apresentam-se clinicamente bem e são ditos como tendo **talassemia minor**. Tais indivíduos são hipocrômicos, têm hemácias microcíticas e podem ter uma leve anemia, que de início pode ser diagnosticada, erradamente, como deficiência de ferro. O diagnóstico de talassemia minor pode ser apoiado por eletroforese de hemoglobina, que em geral revela um aumento no nível de HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$)

Beta-talassemia, Talassemias Complexas e Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

Quase todos os tipos de mutação que sabidamente reduzem a síntese de um mRNA ou de uma proteína foram identificados como causadores de β-talassemia. A revisão geral destes defeitos genéticos que se segue é, portanto, instrutiva quanto aos mecanismos mutacionais em geral, descrevendo em particular a base molecular de uma das mais comuns e graves doenças genéticas no mundo. As mutações do complexo de β-globina são separadas em dois grandes grupos que têm fenótipos clínicos diferentes. Um grupo de defeitos, que corresponde a grande maioria dos pacientes, prejudica a produção apenas de β-globina e causa **β-talassemia simples**. O segundo grupo de mutações é aquele no qual grandes deleções causam as **talassemias complexas**, nas quais o gene de β-globina, *bem como* um ou mais dos outros genes — ou a LCR — do grupo de β-globina, é removido. Algumas deleções dentro do grupo de β-globina não causam talassemia, mas sim um fenótipo fascinante, chamado de **persistência hereditária de hemoglobina fetal** (persistência de expressão do gene de γ-globina durante a vida adulta).

A Base Molecular da Beta-talassemia Simples

A β-talassemia simples resulta de muitos tipos diferentes de anomalias moleculares, na maioria mutações de ponto, no gene de β-globina (Quadro 11.4 e Fig. 11.13). A única deleção comum de β-globina em qualquer grupo racial é uma deleção parcial de 619 pares de bases da ponta 3' do gene em pacientes de origem asiática (ver Quadro 11.4). A Hb Lepore, uma variante estrutural de Hb já discutida, deve-se a um crossing over desigual que produz uma deleção de cerca de 7 kb envolvendo os genes δ e β.

A maioria das mutações de β-talassemia diminui a abundância do mRNA de β-globina e são de três tipos: mutantes de promotor, mutantes de recomposição do RNA (mais comum) e mutantes de acréscimos na ponta 5' e na 3' (veja Fig. 11.13). Um número menor de pacientes com β-talassemia tem mutações sem sentido ou mudança de matriz de leitura na região codificante do gene, o que leva à síntese de polipeptídeos instáveis e curtos de

QUADRO 11-4

A Base Molecular da β-talassemia Simples

Tipo	Exemplo	Fenótipo	População Afetada
Deleções*			
Deleções do gene de β-globina	Deleção de 619 pares de bases	β^0	Indiana
Síntese defeituosa de mRNA			
Defeitos de recomposição do RNA (ver Fig. 11.14)	Sítio aceptor anormal do íntron 1: AG → GG	β^0	Afro-americana
Mutantes de promotor	Mutação no ATA box −31 −30 −29 −28 → −31 −30 −29 −28 A T A A → G T A A	β^+	Japonesa
Sítio *cap* do RNA anormal	Transversão A → C no sítio *cap* do mRNA	β^+	Asiática
Defeitos de sinal de poliadenilação	AATAAA → AACAAA	β^+	Afro-americana
mRNA não-funcional			
(Observar os códons finalizadores prematuros, tais como os dois mostrados abaixo, que também reduzem a quantidade de mRNA — ver texto)			
Mutações sem sentido	códon 39 gln → fim CAG → UAG	β^0	Mediterrânea (especialmente na Sardenha)
Mudanças de matriz de leitura	códon 16 (deleção de 1 par de bases) *normal* trp gli lis val asn 15 16 17 18 19 UGG GGC AAG GUG AAC UGG GCA AGG UGA *mutante* trp ala arg fim	β^0	Indiana
Mutações de região codificante que também alteram a recomposição*			
Mutações sinônimas	códon 24 gli → gli GGU → GGA	β^+	Afro-americana

*Duas outras variantes estruturais de hemoglobina que causam β-talassemia são mostradas no Quadro 11.2

Derivado em parte de Weatherall D. J., Clegg J. B., Higgs D. R., Wood W. G. (1995) The hemoglobinopathies. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7.ª ed. McGraw-Hill, New York pp. 3417-3484 e Orkin S. H. (1987) Disorders of hemoglobin synthesis: The thalassemias. *In* Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A. W., Leder P., Majerus P. W. (eds) The Molecular Basis of Blood Diseases. WB Saunders, Philadelphia, pp. 106-126.

β-globina. Algumas variantes estruturais de hemoglobina também prejudicam o processamento do mRNA de β-globina, como exemplificado pela Hb E, já descrita.

Síntese Defeituosa de mRNA. A maioria dos pacientes com β-talassemia com síntese defeituosa de mRNA tem anomalias na recomposição do RNA. Mais de 24 defeitos deste tipo já foram descritos, e sua carga clínica combinada é substancial. Estas mutações também adquiriram alta visibilidade porque seus efeitos na recomposição em geral são inesperadamente complexos, e a análise de mRNAs mutantes contribuiu muito para o conhecimento de seqüências cruciais para o processamento normal do RNA (introduzido no Cap. 3). Os defeitos de recomposição são separados em três grupos (Fig. 11.14), dependendo da região do RNA não-processado na qual está situada a mutação.

Grupo 1. Mutações de Junções de Corte. Este grupo inclui mutações nas junções de corte 5' doadora ou 3' aceptora dos íntrons, ou nas seqüências de consenso que circundam as junções. A natureza crítica do dinucleotídeo conservado GT no sítio 5' doador do íntron e a AG no sítio receptor 3' do íntron (ver Cap. 3) é aparente pela perda completa da recomposição normal que resulta de mutações nestes dinucleotídeos (ver Fig. 11.14B). A inativação do sítio aceptor normal elicita o uso de outras seqüências similares a aceptores em outra parte do RNA precursor. Estes sítios alternativos sã chamados de **sítios crípticos de corte** porque normalmente não são usados pelo aparato de recomposição quando o sítio correto está disponível. Os sítios crípticos de corte aceptor ou doador podem ser encontrados em éxons ou íntrons e podem ser usados isoladamente ou em competição com outros sítios crípticos ou o sítio normal de corte.

A importância das seqüências adjacentes de consenso para os dinucleotídeos doador ou aceptor também é ilustrada pelo efeito das mutações. Assim, a substituição do quinto ou do sexto nucleotídeo da seqüência doadora do íntron 1 reduz a efetividade do evento normal de recomposição, mas, como ainda ocorre alguma recomposição normal, os fenótipos são os de β^+-talassemia.

Grupo 2. Mutações de Íntron. Uma mutação dentro de um sítio críptico de corte pode acentuar seu uso tornando-o mais similar ou idêntico ao sítio normal de corte. Um sítio críptico

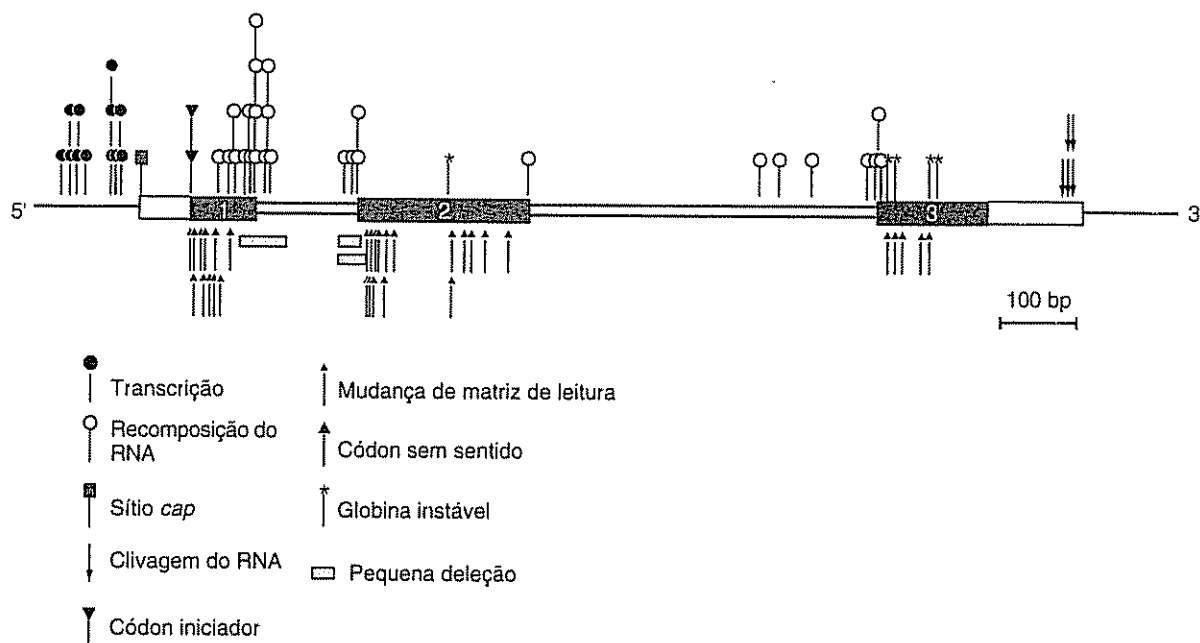



Fig. 11.13 Mutações de ponto representativas que causam β-talassemia Note a distribuição das mutações ao longo do gene e que as mutações afetam todo o processo necessário para a produção de β-globina normal Mais de 100 mutações de ponto diferentes de β-globina estão associadas à β-talassemia simples (Redesenhado de Kazazian H H [1990] The thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990 *In* Miescher L A, Jaffé E R [eds] Seminars in Hematology 27 WB Saunders, Philadelphia, pp 209-228)

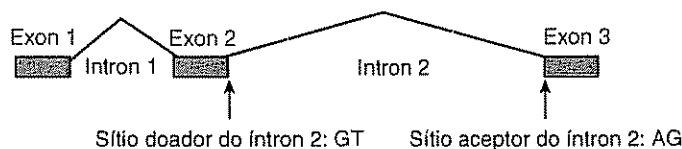
ativado então compete com o sítio normal, com efetividade variável, reduzindo, assim, a abundância do mRNA normal pela diminuição da recomposição do sítio correto, que fica perfeitamente intato (ver Fig. 11.14C). As mutações de sítio críptico de corte em geral são "vazadoras", o que significa que ocorre algum uso do sítio normal, produzindo um fenótipo de β^+-talassemia.

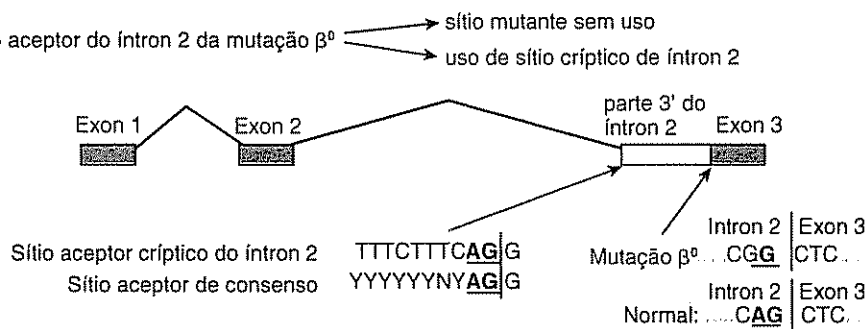
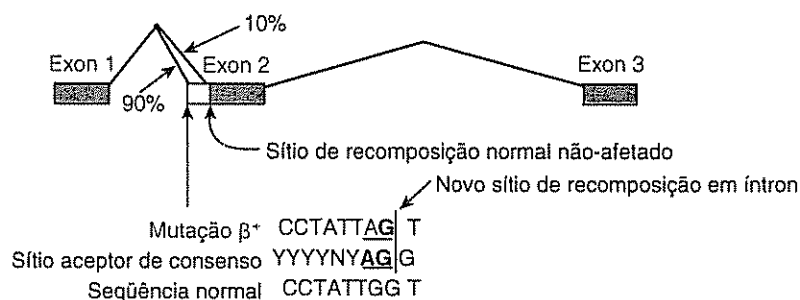
Grupo 3. Mutações em Éxons que Afetam a Recomposição. As mutações causadoras de doenças na região codificante em geral alteram a seqüência de aminoácidos da proteína, enquanto as mutações fora da região codificante causam doença alterando a abundância do mRNA específico. A variante estrutural Hb E ilustra que ambos os problemas podem resultar de uma única mutação (ver Fig. 11.14D). Este efeito duplo é possível porque as mutações nos éxons também podem ativar sítios crípticos de corte. Um defeito comparável que causa β^+-talassemias foi encontrado no códon 24 (ver Quadro 11.4), mas, notadamente, esta mutação não muda o aminoácido codificado (tanto GGT quanto GGA codificam glicina). Este é um exemplo de **mutação sinônima** que não é de efeito neutro.

mRNAs Não-funcionais. Alguns mRNAs são não-funcionais e não podem dirigir a síntese de um polipeptídeo completo porque a mutação gera um códon finalizador prematuro, que termina a tradução prematuramente. Duas mutações de β-talassemia perto do terminal amino exemplificam este efeito e são mostradas no Quadro 11.4 Em uma (Gln39Fim), a falha na tradução deve-se à substituição de um único nucleotídeo que cria uma mutação sem sentido. Na outra, uma mudança de matriz de leitura resulta de uma deleção de um único par de bases no início da seqüência codificante (Gli16[Δ1 pb]). Na nova matriz de leitura, um códon finalizador prematuro é prontamente encontrado mais abaixo, muito antes do sinal de término (ver Quadro 11.4). Como nenhuma β-globina é produzida, ambos os tipos de mutações de mRNA não-funcionais causam β^0-thalassemia. Em contraste, as mudanças de matriz de leitura próximas ao terminal carboxila da proteína permitem que a maioria dos mRNA seja traduzida normalmente ou produza cadeias de globina alongadas, tais como a Hb Tak (veja Quadro 11.2), resultando em uma hemoglobina variante em vez de talassemia.

Além de eliminar a produção do polipeptideo β-globina, os códons sem sentido, incluindo os dois descritos, em geral levam a uma redução na abundância do mRNA mutante. Os mecanismos subjacentes a este fenômeno, chamados de **decaimento de mRNA mediado sem sentido**, não são totalmente compreendidos, mas o efeito parece ser restrito a códons sem sentido situados há mais de 50 pares de bases de 5' do éxon final: éxon de junção.

Defeitos nos Acréscimos 5' e 3' do mRNA de Beta-Globina. Duas mutações de β^+-talassemia destacam a natureza crucial das modificações pós-transcricionais de todos os mRNAs, o acréscimo na extremidade 5' do RNA (no sítio *cap*) e a poliadenilação da ponta 3' do mRNA (ver Quadro 11.4). Descobriu-se um paciente asiático que tem uma transversão A → C no primeiro nucleotídeo da mensagem (o sítio *cap* é uma purina em 90% dos mRNAs eucarióticos). Esta mutação pode impedir a adição do *cap*, uma 7-metilguanosina, expondo, assim, o RNA à degradação. A poliadenilação do mRNA ocorre após sua clivagem enzimática, e o sinal para o sítio de clivagem, AAUAAA, é encontrado perto da ponta 3' da maioria dos mRNAs eucarióticos. Um paciente com uma substituição que muda a seqüência de sinal para AACAAA produz apenas uma pequena fração de mRNA de β-globina que foi poliadenilada na posição normal.

A Padrão normal de recomposição

B Sítio aceptor do íntron 2 da mutação β⁰ → sítio mutante sem uso; → uso de sítio críptico de íntron 2

C Mutação em pb 110 β⁺ de íntron 1 em um sítio aceptor críptico → uso reduzido de sítio normal não-afetado; → uso preferido de sítio mutante

D Hb E: mutação em éxon de sítio doador críptico → uso reduzido de sítio normal; → uso moderado de sítio criptico

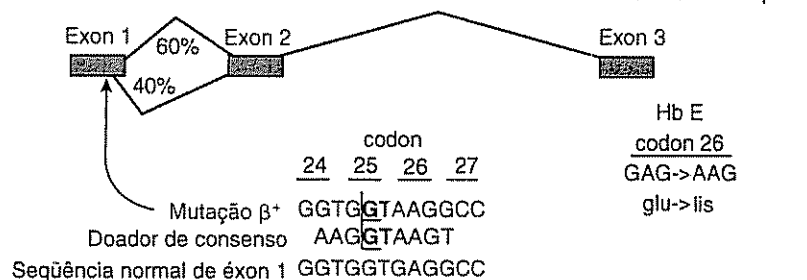



Fig. 11.14 Exemplos de mutações que perturbam a recomposição normal (A) do gene de β-globina para causar a β-talassemia B. Uma *mutação no íntron* 2 (A → G) no sítio aceptor de corte normal aborta a recomposição normal Esta mutação resulta no uso de um sítio aceptor críptico no íntron 2 O sítio críptico ajusta-se perfeitamente à seqüência de consenso aceptora de corte (onde Y = a pirimidina T ou C) O mRNA feito por este gene mutante não pode codificar a β-globina porque o éxon 3 foi aumentado em 5' pela inclusão de seqüências do íntron 2 no mRNA recomposto alternativamente. C. Uma *mutação no íntron* 1 (G → A no par de bases 110 do íntron 1) ativa um sítio críptico aceptor pela criação de um dinucleotídeo AG e pelo aumento da semelhança do sítio com a seqüência aceptora de consenso O mRNA de globina assim formado está alongado (19 nucleotídeos extras) no lado 5' do éxon 2; é introduzido um códon finalizador prematuro no transcrito Resulta o fenótipo A/β^{+}-talassemia porque o sítio aceptor correto ainda é usado, embora em apenas 10% do nível do tipo selvagem D. No *defeito de* Hb E, a mutação de sentido trocado (Glu26Lis) no códon 26 no éxon 1 ativa um sítio críptico doador de corte que compete efetivamente com o sítio doador normal É feito um uso moderado desta via alternativa de recomposição, mas a maioria do RNA ainda é processada a partir do sítio correto, o que resulta em uma branda β^{+}-talassemia

A Base Molecular das Talassemias Complexas e a Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal

As grandes deleções que causam as **talassemias complexas** removem o gene de β-globina e mais um ou mais outros genes — ou a LCR — do grupo β-globina. Assim, os indivíduos afetados têm expressão reduzida de β-globina e de mais uma ou mais outras cadeias tipo β. Estas condições são denominadas de acordo com os genes deletados, isto é, $\delta\beta^0$-talassemia ou $\gamma\delta\beta^0$-talassemia, e assim por diante. As deleções que removem a LCR de β-globina começam aproximadamente de 50 a 100 kb antecedentes ao grupo do gene de β-globina e estendem-se a 3' em vários graus (Fig. 11.15). Embora algumas destas deleções, tais como a deleção hispânica, deixem intatos alguns ou todos os genes do locus de β-globina, elas eliminam a expressão do grupo todo, causando, assim, uma $\varepsilon\gamma\delta\beta$-talassemia. Tais mutações demonstram a dependência total de LCR da expressão gênica do grupo do gene de β-globina (ver Fig. 11.5).

Um segundo grupo de deleções do grande aglomerado do gene de β-globina de significado médico são as que deixam pelo menos um dos genes γ intato (ver Fig. 11.15). Os pacientes portadores de tais mutações têm apenas duas manifestações clínicas, dependendo da deleção: $\delta\beta^0$ talassemia ou persistência hereditária de hemoglobina fetal (HPFH), uma condição benigna decorrente da perturbação na mudança perinatal da síntese de globina γ para β. Os homozigotos com uma destas condições são viáveis porque o gene ou genes γ ainda estão ativos após o nascimento em vez de desligados, como normalmente ocorre. Como resultado, a síntese de Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) continua na fase pós-natal em um alto nível, compensando a ausência de Hb A.

A natureza clinicamente inócua da HPFH deve-se a uma produção substancial de cadeias γ, produzindo um nível maior de

Heterogeneidade Clínica Decorrente de Heterogeneidade Genética: Exemplos das Hemoglobinopatias

A heterogeneidade clínica nas doenças genéticas em geral pode ser explicada pela heterogeneidade genética, que é de três tipos gerais exemplificados pelas hemoglobinopatias:

1. **Alelos diferentes e interações alélicas em compostos genéticos.** Os alelos diferentes de um único gene podem ser associados a fenótipos de gravidade variável (p. ex., alelos de β-talassemia associados a β^0 ou β^+-talassemia). Se um paciente com uma doença recessiva porta dois alelos diferentes causadores de doença em um locus (é um composto genético, ver Cap. 5), o fenótipo pode variar se houver interação dos alelos.
2. **Genes diferentes.** As mutações em genes diferentes podem produzir fenótipos similares, mas em geral distinguíveis (p. ex., α- *versus* β-talassemia).
3. **Genes modificadores (interações de locus).** Alelos específicos selvagens ou de doença de um ou mais genes (genes modificadores) às vezes podem modificar drasticamente a gravidade clínica do fenótipo devido às mutações em um gene causador de doença. Esta fonte de heterogeneidade clínica é sem dúvida a mais comum e é vagamente englobada pelo termo "**fundo genético**", mas, até agora, foram identificados poucos genes modificadores, e a grande maioria das heterogeneidades clínicas nas doenças genéticas permanece inexplicada. Um gene modificador conhecido que afeta a gravidade da β-talassemia será descrito mais adiante.

Interações Alélicas no Locus de Beta-globina

Um mecanismo pelo qual mutações diferentes em um único gene podem produzir variação fenotípica é demonstrado por compostos genéticos no locus de β-globina. Duas ou mais das mutações mais comuns de β-globina, tais como as que levam à Hb C, Hb S e Hb E, e alguns dos alelos de talassemia às vezes estão presentes em freqüências relativamente altas na mesma população. Em conseqüência, não é raro encontrar pessoas em algumas partes do mundo (p. ex., África) que são compostos genéticos (um termo alternativo é "heterozigoto composto") para mutações diferentes no locus de β-globina e que têm fenótipos clínicos que resultam da interação de dois alelos mutantes diferentes. Por exemplo, os pacientes que portam os alelos de anemia falciforme e de β-talassemia ($\beta^{tal}\beta^S$) têm uma doença que varia em gravidade dependendo da mutação específica de β-talassemia que herdam: aqueles com um alelo de β^0-talassemia grave têm um distúrbio intenso, que se assemelha à anemia falciforme, enquanto aqueles com um alelo de β^+ branda apresentam-se clinicamente bem, assim como os pacientes com o traço falcêmico. Esta interação de alelos resulta do fato de que os portadores de β^0 produzem menos Hb A e, portanto, têm uma fração de Hb S mais alta que os portadores de β^+ branda.

Genes Modificadores (Interações de Locus) na Beta-talassemia

As distribuições geográficas de muitos dos alelos mutantes comuns de α- e β-globina freqüentemente se superpõem (p. ex., no Mediterrâneo). Como resultado, são conhecidos pacientes ocasionais que co-herdaram mutações nos loci α e β. O estudo de tais pacientes indicou que podem ocorrer modificações significativas do fenótipo bioquímico e clínico das mutações em um locus quando o outro locus também tem um alelo mutante. Por exemplo, os homozigotos para β-talassemia que também herdam um alelo de α-talassemia às vezes têm uma β-talassemia menos grave. O desequilíbrio de síntese de cadeias de globina que ocorre na β-talassemia, refletindo o excesso relativo de cadeias α, é melhorado pela diminuição da produção de cadeias α que resulta da mutação de α-talassemia. Este exemplo de interação gênica ilustra, no nível molecular, por que o mesmo gene mutante pode ter efeitos fenotípicos variáveis em diferentes indivíduos e até mesmo em diferentes membros afetados de uma única família. A expressividade e a penetrância variáveis em outros distúrbios às vezes podem ser decorrentes de interações comparáveis entre produtos gênicos.

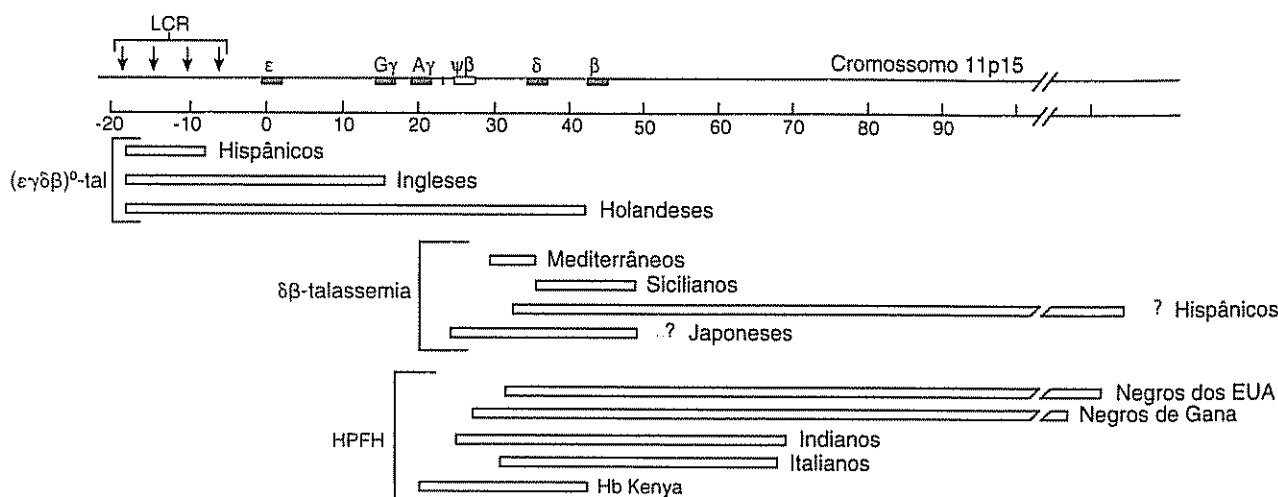



Fig. 11.15 Localização e tamanho das deleções de vários mutantes $\varepsilon\gamma\delta\beta$-talassemia. $\delta\beta$-talasemia e HPFH. Note que as deleções da região controladora de locus (LCR) abolem a expressão de todos os genes no grupo de β-globina. As deleções responsáveis por HPFH e $\delta\beta$-talassemia superpõem-se (ver texto) (HPFH = persistência hereditária de hemoglobina fetal. Redesenhado de Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A. W. [1994] Hemoglobin switching. *In* Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A. W., Leder P., Varmus H. [eds] The Molecular Basis of Blood Diseases. WB Saunders, Philadelphia. pp. 107-155.)

Hb F nos heterozigotos (de 17% a 35% de Hb F) do que em geral é visto nos heterozigotos para a $\delta\beta^0$ talassemia (de 5% a 18% de Hb F). As deleções que causam $\delta\beta^0$-talassemia superpõem-se às que causam HPFH (ver Fig. 11.15), e não está claro por que os pacientes com HPFH têm níveis mais altos de expressão do gene γ. Uma possibilidade é que algumas deleções HPFH coloquem os acentuadores mais perto do genes de γ-globina (ver Fig. 11.15). A compreensão dos mecanismos que levam a uma alta expressão pós-natal do gene γ nos pacientes com HPFH pode tornar possível a expressão de Hb F em altos níveis nos pacientes com talassemia β, uma mudança que trataria o distúrbio (ver Cap. 13).

Alguns pacientes com HPFH têm substituições de um único par de bases na região reguladora antecedente aos genes $^A\gamma$ ou $^G\gamma$. Na Grécia, $^A\gamma$ HPFH, por exemplo, há uma mudança G → A de algumas bases 5' para um CCAAT box (um elemento promotor; ver Cap. 3) do gene $^A\gamma$. Estas mutações supostamente alteram a afinidade das proteínas reguladoras (de ligação ao DNA) necessárias para a repressão pós-natal da expressão do gene γ. As pessoas com HPFH sem deleção são clinicamente normais. Sua condição genética é reconhecida de modo acidental durante estudos hematológicos feitos por outros motivos.

CONCLUSÃO

Em retrospecto, foi bom que as hemoglobinopatias fossem o primeiro grupo de doenças genéticas a ser examinado em nível molecular, pois elas exibem muita diversidade de patologia molecular. A maioria das outras condições genéticas resulta de mecanismos de função gênica alterada que tinham sido inicialmente reconhecidos, sob alguma forma, em um distúrbio de hemoglobina. Assim, embora as hemoglobinopatias sejam paradigmas da base genética e mutacional de "doença molecular", a patologia bioquímica de cada doença reflete aspectos diferentes e em geral únicos da estrutura e da função da proteína alterada pela mutação. O próximo capítulo ampliará os conceitos aprendidos sobre as hemoglobinopatias e, descrevendo algumas das doenças genéticas mais importantes que são compreendidas em nível bioquímico e molecular, fornecerá uma visão geral da fisiopatologia que resulta das mutações em várias classes de proteínas.

Referências Gerais

Bunn HF, Forget BG (1986) Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects. WB Saunders, Philadelphia.

Kazazian HH Jr, Antonarakis S (1997) Molecular genetics of the globin genes. *In* Singer M, Berg P (eds) Exploring Genetic Mechanisms. University Science Books, Sausalito, California, pp. 301–336.

McKusick VA (1998) Mendelian Inheritance in Man, Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders, 12th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore. See online version at *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/*

Perutz MF (1987) Molecular anatomy, physiology, and pathology of hemoglobin. *In* Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW (eds) The Molecular Basis of Blood Diseases. WB Saunders, Philadelphia, pp. 127–178.

Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW (1994) Hemoglobin switching. *In* Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, Varmus H (eds) The Molecular Basis of Blood Diseases, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, pp. 107–155.

Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG (1995) The hemoglobinopathies. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 3417–3484.

Wood WG (1996) The complexities of β-globin gene regulation. Trends Genet 12:204–206.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Ingram VM (1956) Specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia hemoglobin. Nature 178:792–794.

Kan YW, Dozy AM (1978) Polymorphism of DNA sequence adjacent to human-globin structural gene: Relationship to sickle mutation. Proc Natl Acad Sci U S A 75:5631–5635.

Lucarelli G, Galimberti M, Polchi P, et al (1990) Bone marrow transplantation in patients with thalassemia. N Engl J Med 322: 417–421.

Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IG (1949) Sickle cell anemia, a molecular disease. Science 110:543–548.

Problemas

1. Uma criança morre de hidropisia fetal. Desenhe um heredograma com os genótipos que ilustrem os dois genitores portadores da base genética da talassemia da criança. Explique por que é improvável que um casal melanésio que eles conheceram em uma clínica de hematologia, que também tenha a α-talassemia, tinha um filho similarmente afetado.

2. Por que a maioria dos pacientes com β-talassemia provavelmente é composto genético? Em que situações você anteciparia que um paciente com β-talassemia teria dois alelos de β-gobina idênticos?

3. Tony, um jovem italiano, apresenta uma β-talassemia moderada, com uma Hb de 7 g/dl (as quantidades normais são de 10 a 13 g/dl). Quando você faz uma transferência Northern de seu RNA de reticulócito, inesperadamente encontra três bandas de mRNA de β-globina, uma de tamanho normal, uma maior que o normal e uma menor que o normal.

   Que mecanismos mutacionais podem explicar a presença das três bandas em um paciente com β-talassemia? *Neste* paciente, o fato de a anemia ser branda sugere que uma fração significativa do mRNA de β-globina normal está sendo produzido. Que tipos de mutação permitiriam que isto ocorresse?

4. Um homem é heterozigoto para a Hb M Saskatoon, uma hemoglobinopatia na qual o aminoácido normal His é substituído por Tir na posição 63 da cadeia β. Sua parceira é heterozigota para a Hb M Boston, na qual His é substituída por Tir na posição 58 da cadeia α. A heterozigose para um destes alelos mutantes produz metemoglobinemia. Cite os genótipos e fenótipos possíveis de sua prole.

5. Uma criança tem um tio paterno e uma tia materna com anemia falciforme. Seus pais não têm a doença. Qual a probabilidade de que a criança tenha anemia falciforme?

6. Uma mulher tem traço falcêmico e seu parceiro é heterozigoto para a Hb C. Qual a probabilidade de que seu filho não tenha anomalias de hemoglobina?

7. Correlacione o seguinte:

___ β-talassemia complexa	1 Hb A detectável
___ β^+-talassemia	2 Três
___ número de genes de α-globina faltando na doença Hb H	3 β-talassemia
___ dois alelos mutantes diferentes em um locus	4 α-talassemia
___ diagnóstico pré-natal de anemia falciforme	5 Alto nível de expressão de cadeia β
___ cadeias β insolúveis	6 Traço de α-talassemia
___ número de genes de globina α faltando na hidropisia fetal com Hb Bart's	7 Composto genético
___ região controladora de locus	8 Genes $\delta\beta$ deletados
___ genótipo $\alpha -/\alpha -$	9 Quatro
___ Hb A_2 aumentada	10 Enzima de restrição HpaI

8. As mutações em seqüências não-codificantes mudam o número de moléculas de proteína produzidas, mas, em geral, cada molécula proteica feita terá a seqüência normal de aminoácidos. Cite exemplos de algumas exceções a esta regra e descreva como são geradas as alterações nas seqüências de aminoácidos.

9. Na Hb Tak, a inserção de dois pares de bases (seja AC ou CA, não é possível saber que inserção ocorreu e o efeito na matriz de leitura de ambas é o mesmo) entre os códons 146 e 147 da cadeia de β-globina leva à adição de 11 aminoácidos ao final do polipeptídeo. Usando a seqüência de nucleotídeos da região codificante do gene de β-globina mostrado na Fig. 3.10, determine a seqüência do novo peptídeo C-terminal responsável pelo aumento de afinidade de oxigênio desta variante de globina.

12

A Base Molecular e Bioquímica das Doenças Genéticas

O exame da base molecular e bioquímica das doenças genéticas começou no capítulo anterior, com as hemoglobinopatias, e neste capítulo se estenderá a outras proteínas e suas doenças correspondentes. No Cap. 11, apresentamos uma visão geral dos mecanismos pelos quais as mutações que causam doenças ocasionam patologias (ver Fig. 11.1) e revisamos as etapas nas quais as mutações podem perturbar a síntese ou o funcionamento de uma proteína (ver Quadro 11.1). Este panorama nos dá uma infra-estrutura para compreender a patogenia de todas as doenças genéticas. Embora as hemoglobinopatias tenham ensinado muito aos geneticistas sobre os mecanismos subjacentes às doenças genéticas, existem muitos outros processos moleculares e bioquímicos que precisam ser considerados. As mutações em outras classes de proteínas em geral perturbam o funcionamento celular e orgânico por processos que diferem dos ilustrados pelas hemoglobinopatias.

Neste capítulo, ampliaremos a descrição dos mecanismos gerais pelos quais as mutações prejudicam a síntese, o processamento ou as associações moleculares das proteínas, e os conseqüentes efeitos no funcionamento das proteínas. As relações entre um defeito molecular e a localização e a natureza de sua patologia clínica também serão examinadas. Para ilustrar os mecanismos das doenças, na maioria dos casos usamos doenças bem conhecidas, tais como a **fenilcetonúria (PKU)**, a **fibrose cística (CF)**, a **hipercolesterolemia familiar**, a **distrofia muscular Duchenne (DMD)** e a **doença de Alzheimer (AD)**. Em alguns casos, distúrbios menos comuns, tais como a **porfiria intermitente aguda** e a **doença da célula I**, são incluídos, pois demonstram melhor um princípio específico.

A importância de ensinar genética médica a partir de princípios gerais é ilustrada pelo fato de que mais de 1.000 genes associados a distúrbios monogênicos já foram identificados. Seria impossível lembrar a patologia molecular e a fisiopatologia de cada condição ou mesmo de cada categoria bioquímica de doença. Além disso, existem pelo menos 3.000 outras doenças monogênicas nas quais o defeito bioquímico ainda está por ser identificado, e dos 30.000 a 50.000 genes no genoma, muitos dos quais serão identificados nas próximas décadas, vários estão implicados em condições geneticamente determinadas.

DOENÇAS DEVIDAS A MUTAÇÕES EM CLASSES DIFERENTES DE PROTEÍNAS

As proteínas desempenham um grande número de funções diferentes, algumas das quais são apresentadas no Quadro 12.1 com suas doenças genéticas associadas. Como sugere a lista, as mutações em todas as classes funcionais de proteínas podem levar a um distúrbio genético. O reconhecimento de que uma doença resulta de anomalia em uma proteína de uma determinada classe em geral é útil na compreensão de sua patogenia e herança, bem como na determinação da terapia. Nesta seção, descreveremos doenças genéticas importantes que afetam proteínas representativas de muitos dos grupos citados. Nem todas as doenças citadas no Quadro 12.1 serão revistas aqui. O leitor interessado poderá encontrar muitas informações sobre as doenças genéticas que são compreendidas no nível bioquímico nas referências citadas ao final do capítulo. O tratamento das doenças genéticas, incluindo o de muitas das condições descritas neste capítulo, será apresentado no Cap. 13.

Proteínas de Manutenção, Proteínas Especiais e Doenças Genéticas

As proteínas podem ser separadas em duas classes gerais com base em seu padrão de expressão: **proteínas de manutenção**, que estão presentes em absolutamente todas as células e têm papéis fundamentais na manutenção da estrutura e da função celular, e **proteínas especiais** histoespecíficas, que são produzidas em apenas um tipo celular ou em um número limitado de tipos celulares. Elas têm funções únicas, que contribuem para a individualidade das células nas quais são expressas. Esta classe de distinção não é necessariamente absoluta. Uma proteína com um papel de manutenção na maioria das células pode estar presente em um nível mais alto em alguns tecidos nos quais tem uma função mais especializada. A maioria dos tecidos em eucariontes superiores, tais como humanos, expressa de 10.000 a 15.000 genes. Até 90% das espécies de RNA mensageiro (mRNA) encontradas em um tecido também estão presentes em muitos outros tecidos e codificam proteínas compartilhadas de manutenção. Os 10% restantes codificam as proteínas especiais do tecido.

QUADRO 12–1

Alguns Exemplos de Classes de Proteínas Associadas a Doenças Monogênicas

Função		Exemplos de Proteínas Afetadas por Mutações (Doença)*	Herança
Enzimas	Literalmente centenas, em todas as áreas do metabolismo, incluindo		
	Aminoácidos	• fenilalanina hidroxilase (PKU)	AR
	Carboidratos	• galactose-1-fosfato uridil transferase (galactosemia)	AR
	Ácidos orgânicos	• metilmalonil-CoA mutase (acidúria metilmalônica)	AR
	Ácidos graxos	• acil CoA desidrogenase de cadeia média (deficiência de MCAD)	AR
	Lipídeos complexos	• hexosaminidase A (doença de Tay-Sachs)	AR
	Purinas	• adenosina desaminase (imunodeficiência combinada grave)	AR
	Porfirinas	• porfobilinogênio desaminase (porfiria intermitente aguda)	AD
Transporte e estocagem	*Entre órgãos*	• hemoglobina (as talassemias, variantes de hemoglobina)	AR
	Membrana organelar	• uma proteína de transporte de cistina lisossômica (cistinose)	AR
	Transporte intracelular	• uma proteína de transporte de cobre (síndrome de Menkes)	XR
	Membrana epitelial	• Cftr, um canal de Cl^- no epitélio dos tecidos afetados na fibrose cística (p. ex., pulmão, pâncreas)	AR
Estrutura das células e dos órgãos	*Extracelular*	• tipos I e II de colágeno (osteogênese imperfeita)	AR, AD
	Membrana celular e citoesqueleto	• proteína do esqueleto da membrana das hemácias, espectrina (esferocitose hereditária)	AD
		• distrofina (distrofia muscular Duchenne e Becker)	XR
	Biogênese organelar	• PEX1, uma ATPase necessária à biogênese da membrana peroxissômica (síndrome de Zellweger)	AR
Homeostasia extracelular	*Proteção imune*	• proteínas do sistema complemento (p. ex., deficiência do complemento C3 → infecções bacterianas recorrentes)	AD, AR
	Hemostasia	• fator VIII (hemofilia A)	XR
	Inibição de protease	• α_1-antitripsina (deficiência → doença pulmonar e hepática)	AR
Expressão gênica desenvolvimental	*Fatores de transcrição*	• PAX6, um fator de homeodomínio de transcrição (aniridia)	AD
		• WT1, um fator de transcrição *zinc finger* (tumor de Wilms)	AD
	Moléculas sinalizadoras	• *sonic hedgehog* (holoprosencefalia)	AD
	Receptores de sinalização	• FGR3 receptor (acondroplasia)	AD
	Proteínas ribossômicas	• proteína ribossomal S19 (anemia de Diamond-Blackfan)	AD
Controle do desenvolvimento e da diferenciação	*Supressores tumorais*	• produto do gene Rb (retinoblastoma e osteossarcoma)	AR
	Oncogenes	• receptor Ret de tirosina cinase (neoplasia endócrina múltipla ou MEN2)	AD
Metabolismo e comunicação intercelular	*Canais célula-célula*	• proteína conexina 43 de junções gap (malformações cardíacas, defeitos de lateralidade)	AR
		• proteína conexina 26 de junções gap (perda auditiva não-sindrômica)	AR
	Receptores de metabólitos	• receptor de lipoproteína de baixa densidade (hipercolesterolemia familiar)	AD
	Receptores de luz	• rodopsina (uma forma de retinite pigmentosa AD)	AD
		• opsinas de luz verde e vermelha (daltonismo ligado ao X)	XR
	Hormônios	• hormônio do crescimento (nanismo)	AR
		• insulina (forma rara de diabetes mellito tipo 2)	AD
	Receptores hormonais	• receptor de vasopressina V2 (diabetes insípido)	XR
		• receptor de andrógeno (insensibilidade androgênica)	XR
		• receptor de insulina (síndrome de Donohue)	AR
	Transdutores de sinal	• a proteína estimuladora de ligação do nucleotídeo guanina da adenilato ciclase (pseudo-hipoparatireoidismo)	AD

*A classificação da proteína foi adaptada e modificada de Stryer L. (1981) Biochemistry, 2.ª ed. WH Freeman, San Francisco
AD = herança autossômica dominante; AR = herança autossômica recessiva; XR = herança recessiva ligada ao X

Conhecer os tecidos nos quais uma proteína é expressa, bem como os tecidos nos quais é expressa em níveis altos, em geral é útil na compreensão da patogenia de uma doença. Várias generalizações podem ser feitas sobre a correlação entre o local de expressão de uma proteína e o local da patologia.

Primeiro, uma mutação em uma proteína histoespecífica em geral produz uma doença restrita a este tecido, embora possam existir efeitos secundários em outros tecidos. Entretanto, a correlação entre o local no qual a proteína é expressa e o local da patologia em uma doença genética, às vezes, pode ser imprevisível. Por exemplo, a mutação em uma proteína histoespecífica pode produzir suas anomalias clínicas primárias em células e órgãos que não aqueles em que a proteína é expressa. Ironicamente, o tecido que não tem a proteína mutante pode até não ser afetado pela patologia. Em conseqüência, não podemos necessariamente deduzir que a patologia em um órgão resulta de uma mutação em um gene expresso principalmente ou apenas neste órgão.

Segundo, embora as proteínas de manutenção sejam por definição expressas na maioria dos tecidos ou em todos eles, as doenças genéticas que afetam estas proteínas raramente causam patologia em cada tecido. (As mutações nos genes que são essenciais a todos os tecidos, tais como a actina, na maioria dos casos provavelmente são incompatíveis com o nascimento.) Os efeitos clínicos das mutações em uma proteína de manutenção com freqüência são limitados a um ou a poucos tecidos, em geral tecidos nos quais a proteína é abundante e serve a uma função especial.

A Correlação entre Genótipo e Fenótipo na Doença Genética

A variação no fenótipo clínico observado em uma doença herdada pode ser devida a um dentre três tipos de variação genética: heterogeneidade alélica, heterogeneidade de locus ou o efeito de genes modificadores.

Heterogeneidade Alélica. Como foi discutido no Cap. 5, a heterogeneidade genética deve-se de modo mais comum à presença de alelos múltiplos em um locus, uma situação chamada de **heterogeneidade alélica** (Quadro 12.2). Em muitos casos, há uma clara correlação **genótipo-fenótipo** entre um alelo específico e um fenótipo específico. A explicação mais comum para o efeito da heterogeneidade alélica no fenótipo clínico é que os alelos que conferem mais *função residual* em geral estão associados a um fenótipo mais brando (p. ex., ver mais adiante a discussão dos alelos da fenilalanina hidroxilase). Em outros casos, os alelos que conferem alguma função residual a uma proteína estão associados a um fenótipo parcial de todo o espectro clínico associado a um alelo nulo. Esta situação ocorre em algumas variantes do gene *CFTR* associadas à ausência congênita de *vas deferens*, mas a nenhuma outra manifestação da CF (ver mais adiante).

Uma segunda explicação da variação baseada em alelos no fenótipo é que a variação fenotípica pode refletir uma *subfunção específica* da proteína mais prejudicada pela mutação. Nesta situação, alguns alelos podem estar associados a fenótipos clinicamente distintos. Estes pontos são bem ilustrados por alguns dos alelos de β-globina causadores de doença descritos no Cap. 11 (ver Quadro 11.1). Assim, os alelos de β-globina que alteram a afinidade com o oxigênio da hemoglobina produzem policitemia ou cianose. Estes fenótipos específicos em geral são tão diferentes dos fenótipos associados a alelos de grave perda de função (p. ex., talassemia no caso das cadeias de globina) que não é óbvio, do ponto de vista clínico, que estas doenças resultem de mutações que afetam a mesma proteína.

Finalmente, deve-se notar que as conseqüências bioquímicas e clínicas de uma mutação específica em uma proteína em geral são imprevisíveis e podem ser únicas deste alelo. Por exemplo, não se poderia prever que o alelo mais comumente associado à deficiência de α_1-antitripsina (α_1-AT) (o alelo *Z*) iria causar doença hepática porque a mutação leva a proteína a formar agregados intracelulares nos hepatócitos (ver mais adiante).

Heterogeneidade de Locus. A heterogeneidade genética também surge da associação de mais de um locus com uma condição clínica específica, uma situação chamada **heterogeneidade de locus** (Quadro 12.2). Este fenômeno é ilustrado pela descoberta de que as mutações em qualquer um dos cinco genes pode levar à hiperfenilalaninemia (Quadro 12.3). Uma vez que a heterogeneidade de locus tenha sido documentada, a cuidadosa comparação do fenótipo associado a cada gene comumente revela que o fenótipo não é tão homogêneo como se pensava a princípio.

Genes Modificadores. Às vezes, mesmo a mais sólida correlação genótipo-fenótipo não é confirmada em um determinado paciente. Por exemplo, os pacientes com CF homozigotos para a mutação mais comum de CF têm doença pulmonar altamente variável, como será discutido mais adiante. Tal variação fenotípica pode, a princípio, ser atribuída a fatores ambientais ou à ação de outros genes, chamados de **genes modificadores**. Hoje em dia, alguns genes modificadores para distúrbios humanos monogênicos já foram identificados. Um exemplo é citado no final do Cap. 11: a melhora dos homozigotos para β-talassemia que também herdam um alelo de α-talassemia. Os genes modificadores apenas raramente serão alelos causadores de doença em outros loci. Com mais freqüência, eles serão polimorfismos ou variantes benignas raras que de algum modo modulam a gravidade da doença decorrente de mutações patogênicas em outro locus. O efeito modificador de alelos do gene de apolipoproteína E (*APOE*) sobre a idade de início da AD, revisto mais adiante, é um exemplo de destaque.

QUADRO 12–2

Vários Tipos de Heterogeneidade Associados a Doenças Genéticas

Tipo de Heterogeneidade	Definição	Exemplo
Heterogeneidade genética		
Heterogeneidade alélica	A ocorrência de mais de um alelo em um locus	• Alelos de β-talassemia • Mutações de fenilalanina hidroxilase
Heterogeneidade de locus	A associação de mais de um locus a um fenótipo clínico específico	• Defeitos de biopterina causando hiperfenilalaninemia • Síndrome de Sanfilippo
Heterogeneidade clínica ou fenotípica	A associação de mais de um fenótipo a mutações em um só locus	• Mutações de fenilalanina hidroxilase causando PKU, PKU variante ou hiperfenilalaninemia não-PKU • Mutações de α-iduronidase causando síndrome de Hurler ou síndrome de Scheie

PKU = Fenilcetonúria

QUADRO 12-3

A Heterogeneidade de Locus das Hiperfenilalaninemias

Defeito Bioquímico	Incidência/10^6 Nascimentos	Enzima Afetada	Localização Gênica	Herança	Tratamento
Mutações na apoenzima fenilalanina hidroxilase					
PKU clássica	5–350	PAH	12q24.1	AR	Dieta com pouca fenilalanina
PKU variante	PKU menos que clássica	PAH	12q24.1	AR	Dieta pobre em fenilalanina (menos restritiva que a necessária para tratar a PKU)
Hiperfenilalaninemia não-PKU	15–75	PAH	12q24.1	AR	Nenhum, ou dieta pobre em fenilalanina menos restritiva
Mutações nos genes codificantes de enzimas do metabolismo de tetraidrobiopterina					
Reciclagem bloqueada de BH_4	1–2	PCD	10q22	AR	Dieta pobre em fenilalanina + L-dopa, 5-HT, carbidopa
		DHPR	4p15.31	AR	Dieta pobre em fenilalanina + L-dopa, 5-HT, carbidopa + ácido folínico
Síntese bloqueada de BH_4	Rara	GTP-CH	14q22	AR	Dieta pobre em fenilalanina + L-dopa, 5-HT, carbidopa + ácido folínico + doses farmacológicas de BH_4
		6–PTS	11q22.3–23.3	AR	Como acima

5-HT = 5-hidroxitriptofano; 6-PTS = 6-piruvoiltetraidropterina sintase; BH_4 = tetraidrobiopterina; DHPR = diidropteridina redutase; GTP-CH = guanosina trifosfato cicloidrolase; PAH = fenilalanina hidroxilase; PCD = pterina 4-α-carbinolamina desidratase; PKU = fenilcetonúria.

DEFEITOS ENZIMÁTICOS

As enzimas são catalisadores biológicos que medeiam, com grande eficiência, a conversão de um substrato em um produto. Fora alguns ácidos ribonucleicos (RNAs) catalíticos envolvidos no processamento do RNA, as enzimas são proteínas. A diversidade de substratos nos quais as enzimas atuam é levemente sugerida no Quadro 12.1. A lista inclui apenas algumas enzimopatias importantes, que no momento chegam a centenas. Discutiremos primeiro um dos grupos mais conhecidos de erros hereditários do metabolismo, as hiperfenilalaninemias, que surgem da atividade deficiente da fenilalanina hidroxilase. Vários defeitos enzimáticos adicionais de significado serão, então, brevemente examinados. No resumo, as características gerais da fisiopatologia das enzimopatias são apresentadas.

Aminoacidopatias

As Hiperfenilalaninemias

As anomalias que levam a um aumento no nível sanguíneo de fenilalanina, mais notadamente a PKU, ilustram quase todos os princípios de genética bioquímica importantes para os defeitos enzimáticos. As causas bioquímicas da hiperfenilalaninemia são ilustradas na Fig. 12.1, e as principais características da doença associadas a mutações nos cinco loci de hiperfenilalaninemia são apresentadas no Quadro 12.2. Todas as anomalias genéticas do metabolismo da fenilalanina são decorrentes de mutações de perda de função no gene que codifica a fenilalanina hidroxilase (*PAH*) (Fig.12.1) ou nos genes necessários para a síntese ou a reutilização de seu co-fator, a tetraidrobiopterina (BH_4). Assim, nestas últimas condições, a perda de função de PAH é uma *anomalia secundária* (como descrito no Quadro 11.1) de uma mutação em um gene codificante de um componente da via de biopterina.

Fenilcetonúria. A PKU clássica foi corretamente chamada de epítome dos erros hereditários do metabolismo. É um distúrbio autossômico recessivo do metabolismo da fenilalanina, resultante de mutações no gene codificante de PAH, a enzima que converte fenilalanina em tirosina (ver Fig. 12.1 e Quadro 12.3). A descoberta da PKU por Følling, em 1934, marcou a primeira demonstração de um defeito genético como causa de retardo mental. Devido à sua incapacidade de degradar a fenilalanina, os pacientes com PKU acumulam este aminoácido nos líquidos corpóreos. A hiperfenilalaninemia prejudica o desenvolvimento do sistema nervoso central no início da lactância e interfere no funcionamento do cérebro maduro. Uma pequena fração da fenilalanina total é metabolizada por vias alternativas, produzindo quantidades aumentadas de ácido fenilpirúvico (um cetoácido e o composto responsável pelo nome da doença) e outros metabólitos secundários, que são excretados na urina. Ironicamente, embora o defeito enzimático já seja conhecido há décadas, o exato mecanismo neuropatológico pelo qual o aumento de fenilalanina danifica o cérebro ainda é desconhecido. O dano neurológico devido ao bloqueio metabólico na PKU clássica pode ser amplamente evitado por modificações na dieta que impedem o acúmulo de fenilalanina. O tratamento da PKU é um paradigma do tratamento de muitas doenças metabólicas cujo resultado pode ser melhorado evitando-se o acúmulo de um substrato enzimático e seus derivados. Este conceito será mais bem descrito no Cap. 13.

Triagem Neonatal. A triagem populacional dos neonatos para a PKU é feita de forma ampla. Ela é o protótipo das doenças genéticas para as quais a triagem de massa neonatal justifica-se (ver Cap. 20). O distúrbio é relativamente comum em algumas populações (até cerca de 1/2, 900 nativivos). O tratamento, se iniciado bem cedo, é efetivo. Sem o tratamento, um grave retardo é inevitável. O teste de triagem é feito alguns dias após o nascimento. Uma gota de sangue é obtida do calcanhar, seca em um papel-filtro e mandada para um laboratório central para dosagem dos níveis sanguíneos de fenilalanina. No passado, as

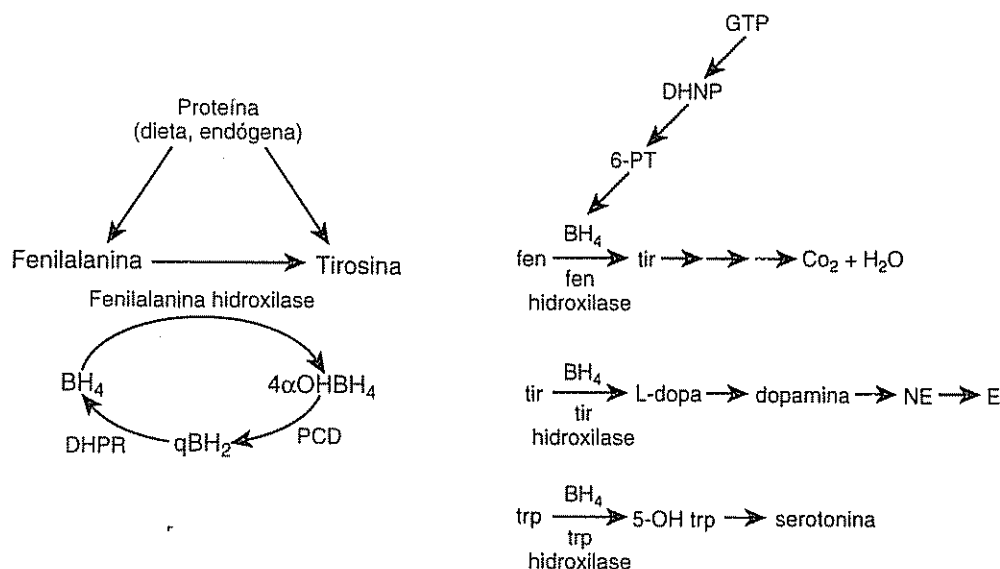



Fig. 12.1 As vias bioquímicas afetadas nas hiperfenilalaninemias BH_4 = tetraidrobiopterina; qBH_2 = quininóide diidrobiopterina. o produto oxidado das reações de hidroxilação, que é reduzido a BH_4 pela diidropteridina redutase (DHPR); fen = fenilalanina; tir = tirosina; trp = triptofano; L-dopa = L-diidroxifenilalanina; NE = norepinefrina; E = epinefrina; 5-OH trpo = 5-hidroxitriptofano; GTP = guanosina trifosfato; DHNP = diidroneopterina trifosfato; 6-PT = 6-piruvoiltetraidropterina; PCD = pterina 4-α-carbinolamina desidratase

amostras eram coletadas antes que a criança deixasse o hospital. A tendência de uma hospitalização muito curta para as mães e os neonatos modificou esta prática. O teste é feito preferencialmente entre 3 e 4 dias de idade, porque o nível de fenilalanina na PKU aumenta em relação ao tempo após o nascimento na primeira semana de vida. Os testes positivos devem ser rapidamente confirmados, pois a demora além de 4 semanas pós-natais no início do tratamento tem efeitos profundos no resultado intelectual dos pacientes com PKU.

Variante de Fenilcetonúria e Hiperfenilalaninemia Não-fenilcetonúria. Embora a PKU resulte de uma ausência absoluta de atividade de PAH (menos de 1% dos controles), os fenótipos menos graves, chamados de hiperfenilalaninemia não-PKU e PKU variante (ver Quadro 12.3), ocorrem quando a enzima PAH mutante tem alguma atividade residual. A **hiperfenilalaninemia não-PKU** é definida pela concentração plasmática de fenilalanina abaixo de 1 mM quando o paciente está recebendo uma dieta normal. Este grau de hiperfenilalaninemia está apenas cerca de 10 vezes acima do normal, mais baixo que as concentrações encontradas na PKU clássica (> 1 mM). O aumento moderado na fenilalanina na hiperfenilalaninemia não-PKU é menos prejudicial ao cérebro ou pode até mesmo ser benigno se o aumento for pequeno (< 0,4 mM), e as pessoas afetadas chamam a atenção clínica apenas porque são identificadas por triagem neonatal. Seu fenótipo normal foi a melhor indicação do nível "seguro" de fenilalanina plasmática que não deve ser ultrapassado no tratamento de pacientes com a PKU clássica. A **variante de PKU** é uma categoria que inclui pacientes com tolerância intermediária de fenilalanina entre a PKU clássica e a hiperfenilalaninemia não-PKU. Tais pacientes precisam de alguma restrição de fenilalanina em sua dieta, mas menor do que a necessária aos pacientes com PKU clássica. A associação destes três fenótipos clínicos com mutações no gene *PAH* é um exemplo claro da heterogeneidade clínica (ver Quadro 12.2).

As Hiperfenilalaninemias: Heterogeneidade Alélica e de Locus

Os Defeitos Moleculares na Fenilalanina Hidroxilase. O gene para PAH foi isolado em 1986 e, subseqüentemente, demonstrou-se um marcante grau de heterogeneidade alélica (ver Quadro 12.3) na população deficiente de PAH. Mais de 400 alelos diferentes já foram reconhecidos. A grande maioria é de mutações raras, que prejudicam a atividade enzimática de PAH e levam à hiperfenilalaninemia, embora também já tenham sido identificados polimorfismos benignos ou variantes benignas menos comuns. Seis mutações diferentes são responsáveis por cerca de dois terços dos cromossomos mutantes conhecidos nas populações de descendência européia (Fig. 12.2). Notadamente, seis outras mutações são responsáveis por cerca de mais de 80% das mutações *PAH* nas populações asiáticas (Fig. 12.2). As mutações restantes causadoras de doenças são individualmente raras. Para registrar e tornar esta informação publicamente disponível, um banco de dados de *PAH* foi desenvolvido por um consórcio internacional.

Em todas as populações, há uma substancial heterogeneidade genética na população mutante *PAH*. Devido ao alto grau de heterogeneidade alélica no locus, a maioria dos pacientes PKU, na maioria das populações, é de **compostos genéticos** (têm dois alelos diferentes causadores da doença), um achado totalmente de acordo com as observações enzimáticas e clínicas de heterogeneidade fenotípica em defeitos de PAH. Embora a princípio parecesse que conhecer o genótipo *PAH* daria uma previsão confiável dos detalhes sobre o fenótipo, esta expectativa não se concretizou. Por exemplo, duas das mutações européias comuns estão associadas aos fenótipos que variam da PKU clássica à PKU variante à hiperfenilalaninemia não-PKU (Quadro 12.4). Assim, hoje está claro que outras variáveis biológicas não-identificadas, incluindo genes modificadores, geram inconsistência fenotípica na PKU, mesmo na presença de identidade genotípica no locus de *PAH*. Conseqüentemente, reconheceu-se que mesmo as características monogênicas como a PKU não são simples.

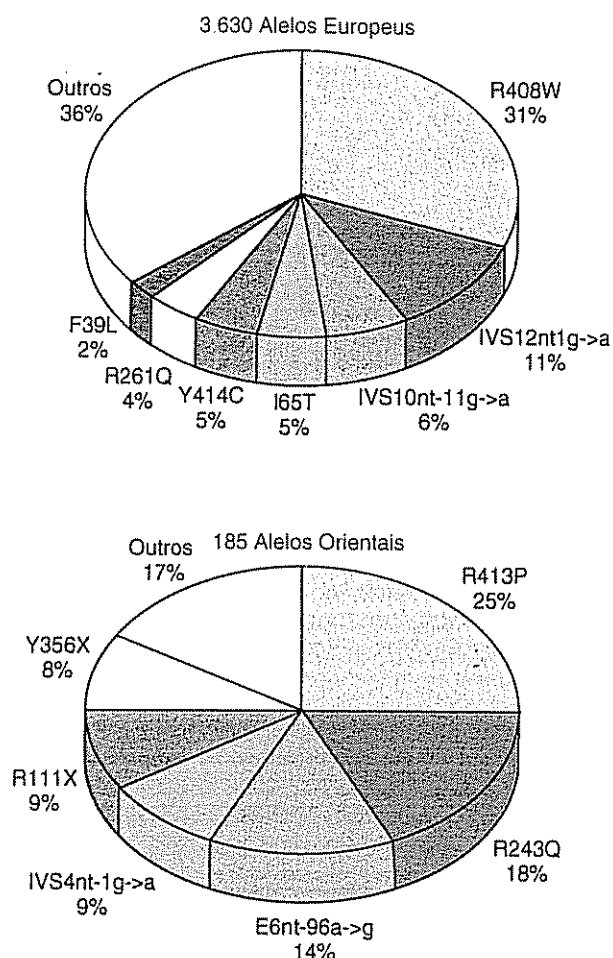



Fig. 12.2 A natureza e a identidade das mutações *PAH* nas populações de descendência européia e asiática (a última da China, Coréia e Japão) (Extraído de Nowacki P M, Byck S, Prevost L e Scriver C R [1998] PAH mutation analysis consortium database: 1997 Prototype for relational locus-specific mutation databases Nucl Acids Res 26:220-225, com permissão da Oxford University Press) É usado o código de uma letra do aminoácido (ver Quadro 3 1) e a nomenclatura de mutação como descrita no Cap. 6

No noroeste da Europa, três dos principais alelos mutantes são amplamente restritos a haplótipos específicos (Quadro 12.4), embora mais de 80 haplótipos de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) ao redor do gene *PAH* já tenham sido identificados. Como foi discutido no Cap. 8, um haplótipo em particular em geral está associado a uma mutação em particular, *em uma população específica*. A associação de uma mutação específica com um haplótipo cromossômico em particular em diferentes subgrupos de uma população sugere que a mutação originou-se de um cromossomo com este haplótipo. No caso da PKU, os dados sugerem origens únicas para vários alelos no noroeste da Europa. A mutação *PAH* mais comum (Arg408Trp) parece ter surgido independentemente em vários cromossomos diferentes, porque ela é encontrada em vários haplótipos diferentes. Ela envolve um sítio CpG hipermutável. Por este motivo, não podemos supor que um haplótipo em particular está associado a uma mutação específica na PKU, exceto em populações bem-definidas.

Defeitos no Metabolismo de Tetraidrobiopterina

A princípio acreditava-se que todas as crianças com hiperfenilalaninemia hereditária tinham uma deficiência primária de PAH. Hoje está claro, entretanto, que em cerca de 1% a 3% destes pacientes o gene *PAH* é normal, e sua hiperfenilalaninemia é o resultado de um defeito genético na formação ou na reciclagem do co-fator de PAH, tetraidrobiopterina (BH_4) (ver Fig. 12.1 e Quadro 12.3). A associação de um único fenótipo, tal como a hiperfenilalaninemia, a mutações em genes diferentes é um exemplo de heterogeneidade de locus (ver Quadro 12.2). Como ilustrado pelas mutações nos genes que codificam a apoenzima PAH e as vias de co-fator biopterina (ver Fig. 12.1), as proteínas codificadas pelos genes que manifestam heterogeneidade de locus em geral atuam em etapas diferentes em uma única via bioquímica. Os pacientes com deficiência de BH_4 foram inicialmente reconhecidos porque, a despeito da bem-sucedida administração de uma dieta pobre em fenilalanina, eles desenvolveram profundos problemas neurológicos no início da vida. Este resultado pobre deve-se em parte à necessidade do co-fator BH_4 de outras duas enzimas, a tirosina hidroxilase e o triptofano hidroxilase. Am-

QUADRO 12–4

Gene de Fenilalanina Hidroxilase: Mutações, Haplótipos e Fenótipos Clínicos em Populações de Descendência Européia

Mutação	% de Atividade	Representação entre Mutações*	Haplótipo Associado†	Fenótipo Associado em Homozigotos‡
Arg 408 Trp	< 1%	31%	1, 2, 5, 44	PKU clássica
IVS 12ntlg → a§	< 1%	11%	3	PKU clássica
IVS10nt − 11g → a	desconhecida	6%	6, 10, 34, 36	PKU clássica
Ile 65 Tre	~25%	5%	9	PKU clássica, PKU variante
			HPA não-PKU	
Tir 414 Cis	30–50%‖	5%	4	PKU variante
			HPA não-PKU	
Arg 261 Gln	30%‖	4%	1, 2, 4, outros	PKU ou PKU variante

*De Nowacki P *et al* (1998) PAH mutation analysis consortium database: 1997 Prototype for relational locus-specific mutation databases Nucl Acids Res 26:220-225

†Do banco de dados de PAH (*www mcgill ca/pahdb*).

‡De Kayaalp E *et al* (1997) Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: A metanalysis of genotype-phenotype correlations Am J Hum Genet 61: 1309-1317

§IVS 12ntlg → indica que o primeiro nucleotídeo do 12.° íntron é "a" substituído por "g"

‖ Não está claro se estas atividades, obtidas por dosagens *in vitro*, refletem a função *in vivo*

bas as hidroxilases são cruciais para a síntese de neurotransmissores monoamina, tais como dopa, norepinefrina, epinefrina e serotonina (ver Fig. 12.1).

Os pacientes com deficiência em BH_4 têm defeitos em uma das etapas na biossíntese de BH_4 a partir de guanosina trifosfato (GTP) ou na regeneração de BH_4 (ver Fig. 12.1). É crucial reconhecer estas condições, pois seu tratamento difere muito da PKU clássica. Por este motivo, todas as crianças com hiperfenilalaninemia também devem ser testadas quanto à deficiência de BH_4. Além do controle dos níveis de fenilalanina do sangue, o objetivo do tratamento destes pacientes é tentar normalizar os neurotransmissores no cérebro administrando os produtos da tirosina hidroxilase e do triptofano hidroxilase, L-dopa e 5-hidroxitriptofano, respectivamente (ver Fig. 12.1 e Quadro 12.3). Como a PKU clássica, estes distúrbios são herdados de modo autossômico recessivo.

Fenilcetonúria Materna. O tratamento em geral bem-sucedido de PKU permite que os homozigotos afetados levem uma vida independente e tenham perspectivas quase normais de paternidade. No passado, muitos pacientes com PKU eram tirados da dieta pobre em fenilalanina na metade da infância sob a suposição (hoje comprovadamente incorreta) de que o funcionamento do sistema nervoso maduro não seria prejudicado com o retorno da hiperfenilalaninemia. Subseqüentemente, descobriu-se que quase toda a prole de uma mulher com PKU que não recebia tratamento era anormal. A maioria tinha retardo mental, e muitos tinham microcefalia, prejuízo de crescimento e malformações, particularmente cardíacas. Como previsto pelos princípios da herança mendeliana, a maioria destes filhos é heterozigota. Assim, seu retardo não se deve à sua constituição genética, mas ao efeito altamente teratogênico dos níveis elevados de fenilalanina na circulação materna. Em conseqüência, é imperativo que as mulheres com PKU que estejam planejando gestações iniciem uma dieta pobre em fenilalanina antes de engravidar.

Defeitos no Metabolismo de Purinas

Síndrome de Lesch-Nyhan

Um bom exemplo de uma relação genótipo-fenótipo decorrente de heterogeneidade alélica é dado por mutações no locus *HPRT* que codifica a enzima ligada ao X hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT) (Fig. 12.3). Os pacientes sem atividade residual de HPRT têm um fenótipo marcante, chamado de síndrome de Lesch-Nyhan e caracterizado por coreoatetose (um distúrbio de movimento), espasticidade, retardo mental variável, superprodução de ácido úrico, que causa gota e cálculos renais, e, mais marcante, automutilação. As anomalias neurológicas podem resultar de mudanças nos níveis de purina do cérebro produzidos pela doença, compatível com a teoria de que algumas purinas são supostos neurotransmissores. Finalmente, os pacientes com deficiência de HPRT também ilustram como a perda da inibição *feedback* normal na regulação de uma via metabólica pode ter conseqüências fisiopatológicas, um princípio importante das doenças genéticas bioquímicas (Fig 12.3).

Algumas pessoas com mutações no gene *HPRT* manifestam apenas um fenótipo parcial da síndrome de Lesch-Nyhan, a hiperuricemia com gota. Em contraste com os pacientes com a síndrome de Lesch-Nyhan, estas pessoas possuem alelos associados a níveis de atividade de HPRT que variam de aproximadamente 1% a 30% do normal. Nenhum dos marcantes achados

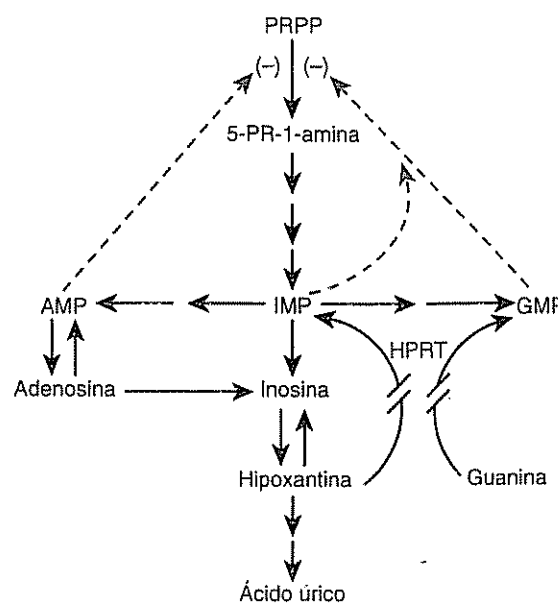



Fig. 12.3 A via de síntese de purinas. Na falta de HPRT, a habilidade em reutilizar hipoxantina e guanina para fazer IMP e GMP é perdida. Em conseqüência, a inibição *feedback* normal por IMP e GMP (*setas interrompidas*) em uma etapa inicial da síntese de purinas é muito reduzida, e a síntese *de novo* de purinas, e finalmente de ácido úrico, é aumentada (*setas contínuas centrais*). PRPP = fosforibosilpirofosfato; 5-PR-1-amina = 5-fosforibosil-1-amina; AMP = adenosina monofosfato; IMP = inosina monofosfato; GMP = guanosina monofosfato; HPRT = hipoxantina guanina fosforibosiltransferase

neurológicos está presente. A deficiência parcial de HPRT deste tipo, entretanto, é responsável por menos de 2% de todos os pacientes masculinos adultos com gota.

Doenças de Armazenamento Lisossômico

Os lisossomos são organelas delimitadas por membranas contendo uma variedade de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação de várias macromoléculas biológicas. Os defeitos genéticos destas hidrolases levam ao acúmulo de seus substratos dentro do lisossomo, o que resulta em disfunção celular e, eventualmente, em morte celular. O acúmulo gradual de substrato é responsável pela característica clínica uniforme destas doenças: sua inexorável progressão. Na maioria destas condições, o armazenamento de substratos manifesta-se clinicamente como um aumento na massa de tecidos e órgãos afetados. Quando o cérebro é afetado, entretanto, como em geral é o caso, o quadro é de neurodegeneração. Os fenótipos clínicos normalmente tornam o diagnóstico de uma doença de armazenamento direto e em geral sugerem a classe de doença de armazenamento ou mesmo o distúrbio específico. Mais de 48 deficiências de hidrolases ou de transporte de membrana lisossômicas já foram descritas. Quase todas são autossômicas recessivas. Finalmente, como será demonstrado por vários exemplos discutidos mais adiante, as doenças de armazenamento lisossômico dão exemplos marcantes tanto de heterogeneidade alélica quanto de locus.

Doença de Tay-Sachs

A doença de Tay-Sachs faz parte de um grupo de doenças heterogêneas de armazenamento lisossômico, as gangliosidoses G_{M2}, que resultam da inabilidade em degradar um esfingolipídeo, o

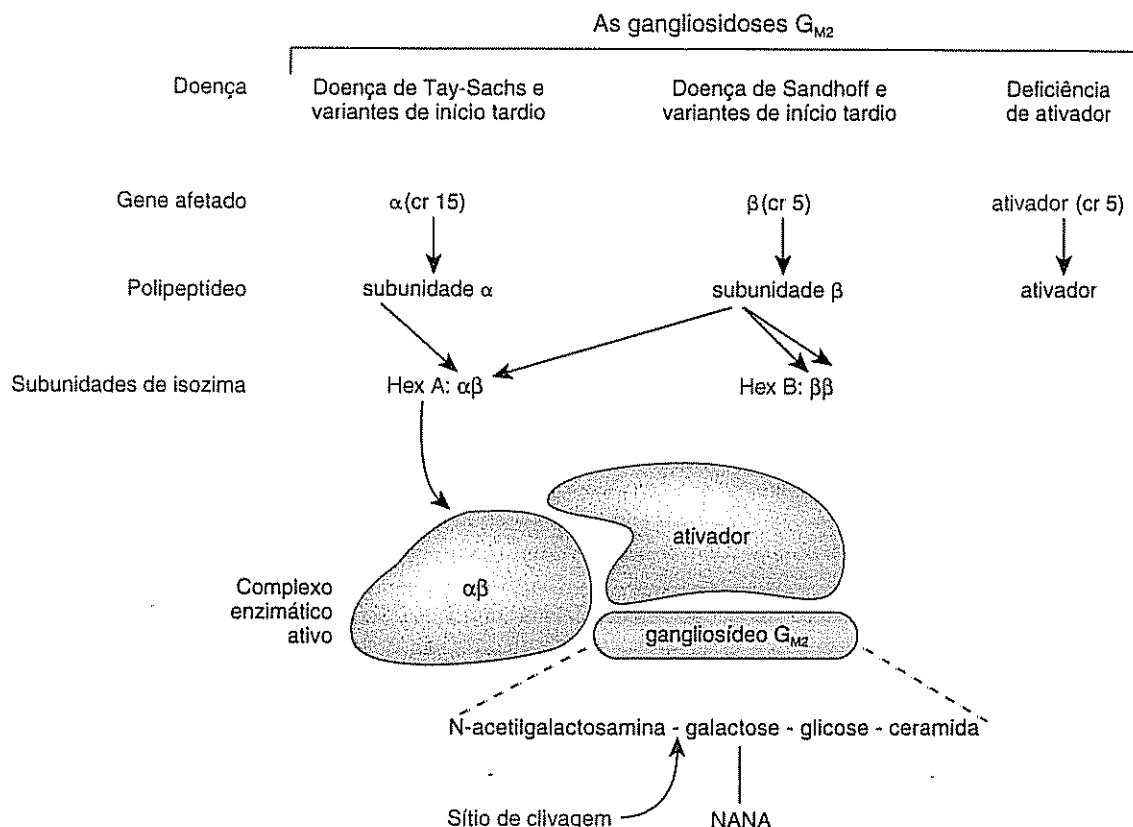



Fig. 12.4 O sistema de três genes necessário para a atividade da hexosaminidase A e as doenças que resultam de defeitos em cada um dos genes A função da proteína ativadora é se ligar ao substrato gangliosídeo e levá-lo para a enzima (Modificado de Sandhoff K. Conzelmann E. Neufeld E F. *et al* [1989] The G_{M2} gangliosidoses *In* Scriver C R. Beaudet A L. Sly W S. Valle D [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease. 6.ª ed. McGraw-Hill. New York. pp 1 807-1 839)

gangliosídeo G_{M2} (Fig. 12.4). A lesão bioquímica é uma deficiência acentuada de hexosaminidase A (hex A). Embora a enzima seja ubíqua, a doença tem seu impacto clínico quase que apenas no cérebro, o local predominante de síntese de gangliosídeo G_{M2}. A hex A cataliticamente ativa é o produto de um sistema de três genes (Fig. 12.4). Estes genes codificam as subunidades α e β da enzima (os genes *HEXA* e *HEXB*, respectivamente) e uma proteína ativadora que deve se associar ao substrato e à enzima antes que esta possa clivar o terminal *N*-acetil-β-galactosamina do gangliosídeo

As manifestações clínicas dos defeitos nos três genes são indistinguíveis, mas eles podem ser diferenciados por análise enzimática. As mutações no gene *HEXA* afetam a subunidade α e perturbam a atividade de hex A, causando a doença de Tay-Sachs (ou variantes menos severas da deficiência de hex A). A maioria dos alelos leva a uma profunda deficiência do mRNA da subunidade α e da atividade de hex A (Quadro 12.5). A mutação mais comum responsável pela doença de Tay-Sachs tanto em populações de judeus Ashkenazi quanto em outras populações é o alelo nulo mostrado na Fig. 12.5. Os defeitos no gene *HEXB*, ou no

QUADRO 12–5

Natureza e Freqüência de Alelos de Hexosaminidase A em Judeus Ashkenazi e Outras Populações*

Mutação	Efeito do Produto Gênico	Freqüência Estimada em Judeus Ashkenazi	Freqüência em Populações Não-Ashkenazi	Fenótipo Homozigoto
Inserção de 4 pb (éxon 11)	Códon prematuro de fim	80%	32%	Doença de Tay-Sachs
Junção de corte no éxon 12: G → C	Recomposição defeituosa do mRNA	10–15%	< 1%	Doença de Tay-Sachs
Gli269Ser mais recomposição anormal	< 3% de atividade residual	2–3%	< 1%	Gangliosidose G_{M2} de início adulto
Outros alelos	Variável	< 1%	> 80%	Variável

*Obtido de Triggs-Raine B. L., Feigenbaum A S J, Natowicz M, *et al.* (1990) Screening for carriers of Tay-Sachs disease among Ashkenazi Jews, N Engl J Med 323:6-12; e Gravel R. A, Clarke J. T R, Kaback M. M, *et al.* (1995) The G_{M2} gangliosidoses *In* Scriver C R., Beaudet A. L., Sly W S, Valle D. [eds] The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp 2 839-2 879

Alelo normal HEXA

... – Arg – Ile – Ser – Tri – Gli – Pro – Asp – ...

... CGT ATA TCC TAT GCC CCT GAC ...

... CGT ATA TCT ATC CTA TGC CCC TGA C .

Alelo Tay-Sachs

– Arg – Ile – Ser – Ile – Leu – Cis – Pro – Fim

Matriz de leitura alterada

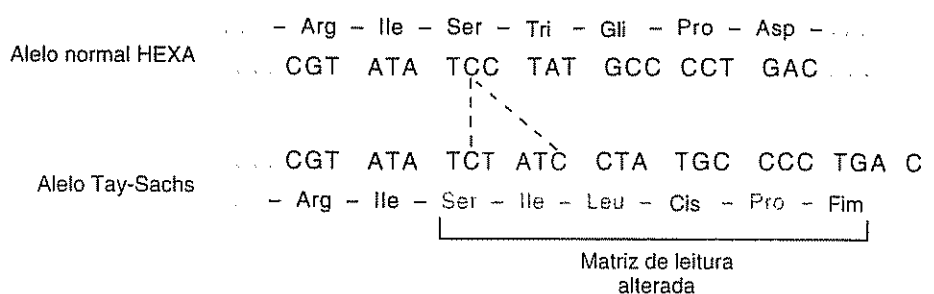



Fig. 12.5 Inserção de quatro bases no gene de hexosaminidase A na doença de Tay-Sachs. levando a uma mudança de matriz de leitura. Esta mutação é a principal causa da doença de Tay-Sachs em judeus Ashkenazi (ver Quadro 12.5) Nenhuma proteína hex A detectável é produzida. o que explica a total deficiência da enzima observada nestes pacientes com início infantil

gene codificante da proteína ativadora, prejudicam a atividade tanto em hex A quanto hex B (ver Fig. 12.4), produzindo a doença de Sandhoff e deficiência da proteína ativadora (que é muito rara), respectivamente.

O curso clínico da doença de Tay-Sachs é particularmente trágico. As crianças afetadas parecem normais até cerca de 3 a 6 meses de idade, mas então gradualmente sofrem uma deterioração neurológica progressiva até a morte, que se dá entre 2 e 4 anos. Os efeitos da morte celular neuronal podem ser vistos diretamente sob a forma do chamado ponto vermelho-cereja na retina, que é a *fovea centralis* circundada por uma mácula clara. Vários alelos já foram identificados no locus *HEXA* e são responsáveis por uma marcante heterogeneidade clínica na deficiência de hex A (ver Quadro 12.5). Nas variantes de manifestação mais tardia da doença, existem pequenas mas definidas quantidades da enzima residual funcional, e a idade de início dos sintomas é um tanto proporcional à atividade residual. Na forma crônica, que pode ser de início até adulto, as manifestações comumente incluem uma disfunção neuronal motora e ataxia devida à degeneração espinocerebelar, mas, em contraste com a doença infantil, a visão e a inteligência permanecem normais, embora se desenvolva psicose em um terço destes pacientes.

Genética de Populações. Cerca de 1 em cada 27 judeus Ashkenazi é portador de um alelo Tay-Sachs, e a incidência de crianças afetadas é 100 vezes mais alta que em outras populações, como foi discutido no Cap. 7. Considera-se o efeito do fundador ou a vantagem do heterozigoto como a explicação mais provável. Embora um alelo predominante freqüentemente esteja associado a uma alta freqüência de portador de um gene de doença em uma única população, a análise molecular inesperadamente demonstrou que três alelos são responsáveis por 99% das mutações em todos os pacientes judeus Ashkenazi e portadores (ver Quadro 12.5). Assim, o motivo para a alta freqüência da deficiência de hex A nas populações de judeus Ashkenazi não é aparente. A presença de três alelos não confirma necessariamente a hipótese da vantagem do heterozigoto, pois suas freqüências podem ser decorrentes de um efeito do fundador. Um benefício prático da caracterização molecular da doença nesta população é o grau no qual foi facilitada a triagem de portadores (pois a maioria dos portadores terá um dos três alelos comuns).

Alelos de Pseudodeficiência de Hex A. Uma conseqüência inesperada da triagem dos portadores de Tay-Sachs na população de judeus Ashkenazi foi a descoberta de uma classe única de alelos hex A, os alelos de pseudodeficiência. Como o nome indica, os dois alelos de pseudodeficiência são clinicamente benignos. As pessoas identificadas como pseudodeficientes nos testes de triagem são compostos genéticos com alelos de pseudodeficiência em um cromossomo e uma mutação Tay-Sachs comum no outro cromossomo. Estas pessoas têm um nível baixo de atividade de hex A (cerca de 20% dos controles em leucócitos) que ainda é adequada para evitar o acúmulo do substrato, o gangliosídeo G_{M2}. A importância dos alelos de pseudodeficiência de hex A é dupla. Primeiro, isto complica o diagnóstico pré-natal, pois um feto pseudodeficiente pode ser incorretamente diagnosticado como afetado. De modo mais geral, a existência dos alelos de pseudodeficiência de hex A indica que os programas de triagem para outras doenças genéticas devem reconhecer que provavelmente existem alelos comparáveis em outros loci, o que pode confundir a caracterização correta dos indivíduos nos testes de triagem ou diagnósticos.

As Mucopolissacaridoses

Os mucopolissacarídeos, ou glicosaminoglicanas (GAGs), são cadeias polissacarídicas sintetizadas por células do tecido conjuntivo como constituintes normais de muitos tecidos. Eles são feitos de longas repetições de unidades dissacarídicas. A natureza das duas moléculas de açúcar é a característica distintiva de uma GAG específica. A degradação destas macromoléculas ocorre no lisossomo e requer a remoção gradativa do monossacarídeo no final da cadeia por uma enzima específica ao monossacarídeo e à ligação envolvida. Assim, uma série de enzimas é necessária para a degradação de qualquer GAG, e em geral uma única enzima participa do catabolismo de mais de uma GAG.

As mucopolissacaridoses são um grupo heterogêneo de doenças de armazenamento no qual os mucopolissacarídeos acumulam-se nos lisossomos em conseqüência de uma deficiência em uma das enzimas necessárias à sua degradação (Quadro 12.6). Nas mucopolissacaridoses específicas, uma ou mais GAGs podem se acumular se a enzima defeituosa for necessária para seu catabolismo. As GAGs não-degradadas apresentam-se na urina, onde podem ser detectadas por testes de triagem.

As duas primeiras mucopolissacaridoses reconhecidas foram a **síndrome de Hunter** recessiva ligada ao X, em 1917, e a **síndrome de Hurler**, mais grave e autossômica recessiva, em 1919. Cada uma destas condições foi inicialmente chamada de "gargoilismo" em função das feições faciais grosseiras das pessoas

QUADRO 12-6

Exemplos de Mucopolissacaridoses

Síndrome	Características Clínicas	Defeito Enzimático: Mucopolissacarídeo Estocado/Excretado	Genética	Comentário
Hurler	Diagnosticada aos 6-18 meses, opacidade da córnea, mudanças esqueléticas na radiografia chamadas de disostose múltipla, hepatosplenomegalia, face grosseira, rigidez das articulações, descarga nasal, hidrocefalia, morte < 10 anos	α-L-Iduronidase; sulfato de dermatan; sulfato de heparan	AR	Provavelmente decorrente de qualquer alelo que extinga a atividade da enzima A maioria dos pacientes provavelmente é de compostos genéticos
Scheie	Início após os 5 anos, inteligência e tempo de vida normais, opacidade da córnea, rigidez das articulações, doença cardíaca valvular, prejuízo visual	α-L-Iduronidase; sulfato de dermatan, sulfato de heparan	AR	Testes de complementação mostram que este fenótipo mais brando afeta o mesmo gene que a síndrome de Hurler
Hurler/Scheie	Fenótipo intermediário às síndromes de Hurler e Scheie	α-L-Iduronidase; sulfato de dermatan, sulfato de heparan	AR	Alguns casos provavelmente são compostos genéticos de alelos Hurler e Scheie
Hunter	Similar à síndrome de Hurler, mas com progresso mais lento, sem opacidade da córnea e com uma única lesão de pele	Iduronato sulfatase; sulfato de dermatan, sulfato de heparan	XR	Um fenótipo mais brando, sem doença do sistema nervoso central, também ocorre com um curso somático muito menos agressivo
Sanfilippo A	Hiperatividade e retardo, neurodegeneração progressiva; características somáticas brandas → subdiagnosticada	Heparan *N*-sulfatase; sulfato de heparan	AR	Predominantemente neurológica, com pouco para distinguir os fenótipos associados aos quatro genes de Sanfilippo
Sanfilippo B	Similar à síndrome de Sanfilippo A	α-*N*-acetilglicosaminidase; sulfato de heparan	AR	Como acima

Modificado por Neufeld E. F., Muenzer J (1995) The mucopolysaccharidoses. *In* Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7ª ed McGraw-Hill, New York, pp 2.465-2.494

afetadas (Fig. 12.6). As crianças afetadas são mentalmente retardadas, têm anomalias esqueléticas, baixa estatura e manifestam outras anomalias citadas no Quadro 12.6.

A síndrome de Hurler deve-se a uma grave deficiência de α-L-iduronidase. Um distúrbio clinicamente distinto, a **síndrome de Scheie**, a princípio foi tido como envolvendo um locus diferente, principalmente devido ao seu fenótipo mais brando. Entretanto, as síndromes de Scheie e Hurler são alélicas, mas as mutações de α-L-iduronidase que causam a síndrome de Scheie parecem estar associadas a uma atividade residual maior. Um fenótipo intermediário, a síndrome de Hurler/Scheie, pelo menos em alguns casos é um composto genético dos alelos de Hurler e Scheie e também pode resultar de dois alelos com atividade intermediária aos alelos de Hurler e Scheie.

A diferença no padrão de herança das síndromes autossômica de Hurler e ligada ao X de Hunter indica que são decorrentes de mutações em genes diferentes. Esta diferença também foi demonstrada em cultura de células. Embora os fibroblastos de pacientes de ambos os tipos acumulem mucopolissacarídeos em meio de cultura, o acúmulo pode ser corrigido pelo co-cultivo de ambos os tipos de células no mesmo frasco. A interpretação que se demonstrou correta foi que a enzima lisossômica deficiente em um tipo celular mutante foi obtida do meio no qual foi liberada pelo outro tipo celular. Este experimento simples foi uma poderosa demonstração de que as duas doenças afetavam proteínas diferentes. A demonstração de que o genoma de um mutante pode corrigir o defeito bioquímico de outro mutante é chamada de **complementação**. Este fenômeno será discutido na próxima seção. Em contraste, o co-cultivo de células Scheie e Hurler não induziu nenhuma correção bioquímica, como depois demonstraram as dosagens enzimáticas, pois eram decorrentes de defeitos na mesma proteína.

A habilidade de uma célula em captar do meio extracelular a enzima lisossômica na qual é deficiente é um mecanismo pelo qual o transplante de células normais (que iriam secretar a enzima) para pacientes com doenças de armazenamento lisossômico pode permitir a correção dos defeitos bioquímicos no resto do corpo. Foram obtidos acentuados benefícios terapêuticos no tratamento de alguns pacientes com mucopolissacaridoses, incluindo a síndrome de Hurler, por transplante de medula óssea (ver Cap. 13).

Outra mucopolissacaridose, a **síndrome de Sanfilippo**, ilustra a ampla heterogeneidade de locus subjacente a um fenótipo clínico relativamente homogêneo. Uma característica clínica importante dos pacientes com síndrome de Sanfilippo é que as anomalias intelectuais e comportamentais são evidentes bem antes das mudanças físicas, que tendem a ser brandas. Inicialmente vista como uma entidade única, esta síndrome pode resultar de uma dentre quatro deficiências enzimáticas, duas das quais são mostradas no Quadro 12.6. Os fenótipos clínicos de pacientes individuais dão pouca base para sugerir que enzima (e, portanto, que gene) está deficiente.

Fig. 12.6 Uma criança com síndrome de Hurler, mostrando as características faciais grosseiras típicas. Aos 5 anos de idade ele tem a altura típica de 3 anos. (De Smith D. W. [1982] Recognizable Patterns of Human Malformation. 3.ª ed. WB Saunders. Philadelphia.)

Análise de Complementação de Doenças Genéticas Humanas

Nos experimentos de co-cultivo descritos, os geneticistas examinaram uma questão que comumente surge no estudo de pacientes com doenças genéticas: duas pessoas com o que parece ser o mesmo distúrbio têm defeitos no mesmo gene? Os experimentos genéticos que abordam esta questão são chamados de **testes de complementação**. Se a correção mútua de um fenótipo ocorre em um teste de complementação, os defeitos genéticos são ditos complementares, os genes afetados devem ser diferentes e ocorreu *complementação intergênica* (mas veja uma exceção, a complementação intragênica, mais adiante). A utilidade dos testes de complementação baseia-se no fato de que estes testes não exigem que se conheça os genes ou as proteínas afetados, mas apenas que se tenha a capacidade de examinar as células quanto à correção de um fenótipo mutante: no caso das doenças de armazenamento de mucopolissacarídeo citadas, a redução do acúmulo de mucopolissacarídeo. A análise de complementação tem sido usada para dissecar a base genética de muitas doenças genéticas humanas.

Se houver dúvida de que o fator corretivo pode ser transferido pelo meio de cultura, células diferentes podem ser fundidas para formar um heterocárion, no qual ambos os núcleos estão dentro de uma única célula (ver Cap. 8). Os experimentos deste tipo demonstraram que o **xeroderma pigmentoso** (XP), uma rara doença associada a um aumento de freqüência de 2.000 vezes no câncer de pele induzido pela luz do sol, é causado por mutação em qualquer um de oito genes, sete dos quais codificam proteínas necessárias ao reparo de excisão do DNA. As pessoas com defeitos brandos podem ter apenas uma sensibilidade aumentada à luz do sol, enquanto os pacientes gravemente afetados estão sujeitos a profundos prejuízos neurológicos, extrema sensibilidade à luz na lactância, sardas anormais, atrofia da pele e, finalmente, nos piores casos, vários tumores (carcinomas, melanomas e neoplasias internas) também.

Testes de complementação em heterocárions deram resultados positivos mesmo sendo conhecidas mutações em dois grupos de células que afetam o mesmo gene. Neste caso, a complementação é dita como sendo *intragênica* (*versus intergênica*) e demonstra que os pacientes têm mutações diferentes, mas alélicas. A complementação intragênica (ou *interalélica*) ocorre apenas quando as proteínas afetadas são não-multímeros, o que indica que a subunidade mutante de um alelo interage com a subunidade mutante de outro alelo de modo a melhorar o funcionamento da proteína multimérica.

Doença da Célula I: Um Defeito no Tráfego de Proteína

Em contraste com as proteínas mitocondriais e de membrana que são direcionadas ao seu endereço subcelular pela informação contida na seqüência primária de aminoácidos, outras proteínas são situadas com base em modificações pós-traducionais (ver Quadro 11.1). Isto é verdade quanto às hidrolases ácidas encontradas nos lisossomos, e, na verdade, a existência e o mecanismo desta forma de tráfego celular não eram reconhecidos até que a doença da célula I, uma grave doença de armazenamento lisossômico autossômica recessiva, fosse investigada no início da década de 1970. Os fibroblastos de pele cultivados de pacientes com doença da célula I continham vários lisossomos anormais, ou inclusões, pelo citoplasma (logo, células de inclusão ou células I).

Na doença da célula I, muitas das hidrolases ácidas normalmente presentes nos lisossomos são encontradas em excesso nos líquidos corpóreos, embora seus níveis celulares estejam gravemente diminuídos. Esta situação incomum surge porque as hidrolases lisossômicas nestes pacientes são anormais devido a uma modificação pós-traducional. Uma hidrolase típica é uma glicoproteína com muitas unidades manose, algumas das quais são fosforiladas. As unidades manose-6-fosfato são essenciais para o reconhecimento das hidrolases por receptores na célula e na superfície da membrana lisossômica. Na doença da célula I, há um defeito na enzima que transfere um grupo fosfato para as unidades manose. O fato de muitas enzimas serem afetadas é compatível com a diversidade de anomalias clínicas. O distúrbio tem uma gama de efeitos fenotípicos, que envolvem características faciais, alterações esqueléticas, grave retardo de crescimento e retardo mental. Caracteristicamente as crianças afetadas sobrevivem por apenas 5 a 7 anos.

Mutações que Impedem a Ligação de Co-fatores do Metabolismo

Algumas proteínas adquirem atividade biológica apenas depois que se associam a grupos prostéticos não-proteicos ou co-fatores que têm um papel crucial na função da proteína. Os co-fatores necessários para a atividade catalítica de algumas enzimas são um exemplo. As mutações que interferem na união de ligandos, síntese, transporte ou remoção de uma proteína (quando a união do ligando é covalente) já são conheci-

Fig. 12.7 Os seis tipos de defeitos genéticos que causam homocistinúria (1) A homocistinúria clássica deve-se à falta de cistationina sintase (2) Nos defeitos de metileno-H_4-folato redutase, a diminuição de metil-H_4-folato prejudica o funcionamento de metionina sintase (3) Vários defeitos diferentes no metabolismo intracelular das cobalaminas levam a uma diminuição secundária na síntese de metilcobalamina (metil-B_{12}) e, assim, no funcionamento da metionina sintase (4) Alguns distúrbios afetam diretamente a formação de metil-B_{12} (5) A absorção de cobalamina intestinal é anormal em alguns pacientes (6) Outros pacientes têm anomalias na principal proteína de transporte extracelular, a transcobalamina II Hidroxicobalamina = hidroxi-B_{12}

das. De todos os distúrbios genéticos, estes estão entre os que mais respondem à terapia bioquímica específica, em particular quando o co-fator ou seu precursor é uma vitamina hidrossolúvel que pode ser dada com segurança em grandes quantidades.

Homocistinúria Decorrente de Deficiência de Cistationina Sintase: Não-ligação de Co-fator

A homocistinúria decorrente de deficiência de cistationina sintase (Fig 12.7) foi uma das primeiras aminoacidopatias a ser reconhecida. O fenótipo clínico desta condição autossômica recessiva em geral é grave (e pode ser confundido com a síndrome de Marfan, um distúrbio do tecido conjuntivo). As características mais comuns incluem o deslocamento do cristalino, retardo mental, osteoporose, ossos longos e tromboembolismo de veias e artérias. Acredita-se que o acúmulo de homocisteína seja o fator central da maior parte, se não de toda, a patologia.

A homocistinúria foi uma das primeiras doenças genéticas que mostrou ser responsiva a vitamina: o piridoxal fosfato é o co-fator da enzima, e a administração de grandes quantidades de piridoxina, o precursor vitamínico do co-fator, em geral atenua a anomalia bioquímica (ver Cap. 13) e o quadro clínico. Em muitos pacientes, a afinidade da enzima mutante pelo piridoxal fosfato é reduzida, o que indica que a conformação alterada da proteína impede a ligação do co-fator.

Distúrbios Decorrentes de Anomalias do Metabolismo de Co-fatores

A perda da função proteica às vezes é secundária à disponibilidade diminuída de uma molécula associada, tal como um co-fator enzimático. Os distúrbios desta classe são bem ilustrados pelos tipos de homocistinúria que resultam de vários defeitos secundários em outra enzima, a metionina sintase, que remetila a homocisteína para formar metionina (ver Fig. 12.7). Como foi demonstrado, o co-fator da metionina sintase, a metilcobalamina, é o produto de uma série complexa de eventos bioquímicos. Vários distúrbios de transporte ou metabolismo da vitamina B_{12} (cobalamina) reduzem a disponibilidade de metilcobalamina e, portanto, prejudicam, secundariamente, a atividade da metionina sintase.

Vários defeitos prejudicam a absorção intestinal de cobalamina ou seu transporte para outras células; outros perturbam etapas específicas do metabolismo de cobalamina (ver Fig. 12.7). A manifestação clínica destes distúrbios é variável e inclui anemia megaloblástica, retardo de desenvolvimento e falta de desenvolvimento. Estas condições em geral são parcial ou completamente tratáveis com altas doses de vitamina B_{12}. Todas são autossômicas recessivas.

Deficiência de Alfa$_1$-Antitripsina: Deficiência de um Inibidor de Protease

A deficiência de α_1-AT é uma importante condição autossômica recessiva que leva à doença pulmonar obstrutiva crônica e à cirrose hepática. O locus α_1-AT, no cromossomo 14, expressa-se principalmente no fígado, que secreta α_1-AT no plasma. Embora a α_1-AT iniba um amplo espectro de proteases, seu principal papel fisiológico é se ligar e inibir a elastase, particularmente a elastase liberada pelos neutrófilos nas vias respiratórias inferiores.

Encontrou-se uma grande variabilidade genética na α_1-AT, com mais de 75 variantes genéticas, chamadas de tipos inibidores de protease (ver Cap. 6). Apenas cerca de uma dúzia destes alelos leva a um risco aumentado de doença pulmonar ou hepática, e apenas o alelo *Z* é relativamente comum. Nas populações caucasianas, a deficiência de α_1-AT afeta cerca de 1 em 2.500 pessoas, e 3% são portadores. O motivo para a freqüência relativamente alta do alelo *Z* nas populações caucasianas é desconhecido, embora a análise de haplótipos de DNA sugira uma origem

Fig. 12.6 Uma criança com síndrome de Hurler, mostrando as características faciais grosseiras típicas. Aos 5 anos de idade ele tem a altura típica de 3 anos. (De Smith D W [1982] Recognizable Patterns of Human Malformation. 3.ª ed. WB Saunders, Philadelphia.)

Análise de Complementação de Doenças Genéticas Humanas

Nos experimentos de co-cultivo descritos, os geneticistas examinaram uma questão que comumente surge no estudo de pacientes com doenças genéticas: duas pessoas com o que parece ser o mesmo distúrbio têm defeitos no mesmo gene? Os experimentos genéticos que abordam esta questão são chamados de **testes de complementação**. Se a correção mútua de um fenótipo ocorre em um teste de complementação, os defeitos genéticos são ditos complementares, os genes afetados devem ser diferentes e ocorreu *complementação intergênica* (mas veja uma exceção, a complementação intragênica, mais adiante). A utilidade dos testes de complementação baseia-se no fato de que estes testes não exigem que se conheça os genes ou as proteínas afetados, mas apenas que se tenha a capacidade de examinar as células quanto à correção de um fenótipo mutante: no caso das doenças de armazenamento de mucopolissacarídeo citadas, a redução do acúmulo de mucopolissacarídeo. A análise de complementação tem sido usada para dissecar a base genética de muitas doenças genéticas humanas.

Se houver dúvida de que o fator corretivo pode ser transferido pelo meio de cultura, células diferentes podem ser fundidas para formar um heterocárion, no qual ambos os núcleos estão dentro de uma única célula (ver Cap. 8). Os experimentos deste tipo demonstraram que o **xeroderma pigmentoso** (XP), uma rara doença associada a um aumento de freqüência de 2.000 vezes no câncer de pele induzido pela luz do sol, é causado por mutação em qualquer um de oito genes, sete dos quais codificam proteínas necessárias ao reparo de excisão do DNA. As pessoas com defeitos brandos podem ter apenas uma sensibilidade aumentada à luz do sol, enquanto os pacientes gravemente afetados estão sujeitos a profundos prejuízos neurológicos, extrema sensibilidade à luz na lactância, sardas anormais, atrofia da pele e, finalmente, nos piores casos, vários tumores (carcinomas, melanomas e neoplasias internas) também.

Testes de complementação em heterocárions deram resultados positivos mesmo sendo conhecidas mutações em dois grupos de células que afetam o mesmo gene. Neste caso, a complementação é dita como sendo *intragênica* (*versus intergênica*) e demonstra que os pacientes têm mutações diferentes, mas alélicas. A complementação intragênica (ou *interalélica*) ocorre apenas quando as proteínas afetadas são não-multímeros, o que indica que a subunidade mutante de um alelo interage com a subunidade mutante de outro alelo de modo a melhorar o funcionamento da proteína multimérica.

Doença da Célula I: Um Defeito no Tráfego de Proteína

Em contraste com as proteínas mitocondriais e de membrana que são direcionadas ao seu endereço subcelular pela informação contida na seqüência primária de aminoácidos, outras proteínas são situadas com base em modificações pós-traducionais (ver Quadro 11.1). Isto é verdade quanto às hidrolases ácidas encontradas nos lisossomos, e, na verdade, a existência e o mecanismo desta forma de tráfego celular não eram reconhecidos até que a doença da célula I, uma grave doença de armazenamento lisossômico autossômica recessiva, fosse investigada no início da década de 1970. Os fibroblastos de pele cultivados de pacientes com doença da célula I continham vários lisossomos anormais, ou inclusões, pelo citoplasma (logo, células de inclusão ou células I).

Na doença da célula I, muitas das hidrolases ácidas normalmente presentes nos lisossomos são encontradas em excesso nos líquidos corpóreos, embora seus níveis celulares estejam gravemente diminuídos. Esta situação incomum surge porque as hidrolases lisossômicas nestes pacientes são anormais devido a uma modificação pós-traducional. Uma hidrolase típica é uma glicoproteína com muitas unidades manose, algumas das quais são fosforiladas. As unidades manose-6-fosfato são essenciais para o reconhecimento das hidrolases por receptores na célula e na superfície da membrana lisossômica. Na doença da célula I, há um defeito na enzima que transfere um grupo fosfato para as unidades manose. O fato de muitas enzimas serem afetadas é compatível com a diversidade de anomalias clínicas. O distúrbio tem uma gama de efeitos fenotípicos, que envolvem características faciais, alterações esqueléticas, grave retardo de crescimento e retardo mental. Caracteristicamente as crianças afetadas sobrevivem por apenas 5 a 7 anos.

Mutações que Impedem a Ligação de Co-fatores do Metabolismo

Algumas proteínas adquirem atividade biológica apenas depois que se associam a grupos prostéticos não-proteicos ou co-fatores que têm um papel crucial na função da proteína. Os co-fatores necessários para a atividade catalítica de algumas enzimas são um exemplo. As mutações que interferem na união de ligandos, síntese, transporte ou remoção de uma proteína (quando a união do ligando é covalente) já são conheci-

Fig. 12.9 O efeito do fumo na sobrevida dos pacientes com deficiência de α_1-antitripsina. As curvas mostram a probabilidade cumulativa de sobrevida em idades específicas de fumantes com e sem a deficiência de α_1-antitripsina. (Redesenhado de Larrson C [1978] Natural history and life expectancy in severe α_1-antitrypsin deficiency, Pi Z. Acta Med Scand 204:345-351.)

para pessoas com o genótipo *Z/Z*, a sobrevida após os 60 anos de idade é de cerca de 60% nos não-fumantes, mas de apenas cerca de 10% nos fumantes (Fig. 12.9). Uma explicação molecular para o efeito do fumo é que o sítio ativo da α_1-AT, na metionina 358, é oxidado tanto pelo fumo de cigarros quanto pelas células inflamatórias, reduzindo, assim, sua afinidade com a elastase em 2.000 vezes.

O campo da **ecogenética**, ilustrado pela deficiência de α_1-AT, ocupa-se com a interação dos fatores ambientais e os genótipos humanos diferentes. É provável que esta área da genética médica adquira crescente importância à medida que forem identificados genótipos que causem um aumento de risco de doença com a exposição a alguns agentes ambientais (p. ex., drogas, substâncias industriais e vírus). Além disso, a variação genética que em si não produz a doença será objeto de crescente investigação na procura da contribuição genética dos distúrbios não-mendelianos, tais como a diabetes melito (ver Cap. 15). No momento, a área mais desenvolvida da ecogenética é a da farmacogenética, que será revista ao final deste capítulo.

DEFEITOS DE PROTEÍNAS RECEPTORAS

O reconhecimento de uma classe de doenças decorrentes de defeitos em moléculas receptoras começou com a identificação, por Goldstein e Brown, em 1974, do receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) como o polipeptídeo afetado na hipercolesterolemia familiar. Sua descoberta esclareceu muito o metabolismo normal do colesterol e a biologia dos receptores de superfície celular em geral. A deficiência do receptor de LDL é representativa de vários distúrbios hoje reconhecidos como decorrentes de defeitos de receptor, alguns dos quais são citados no Quadro 12.1.

Hipercolesterolemia Familiar: Uma Hiperlipoproteinemia Genética

As hiperlipoproteinemias genéticas são de significado clínico em função de seu papel no infarto do miocárdio, uma importante causa de morte e incapacidade. As hiperlipoproteinemias são caracterizadas por níveis elevados de lipídeos plasmáticos (colesterol, triglicerídeos, ou ambos) e de lipoproteínas plasmáticas específicas. Várias formas monogênicas distintas com fenótipos clínicos e bioquímicos diferentes já foram definidas, embora em alguns casos os fenótipos ainda não tenham sido completamente caracterizados. Em cada locus, pode haver mais de um alelo mutante.

A **hipercolesterolemia familiar** é um dos vários distúrbios agrupados como tipo familiar 2 de hiperlipoproteinemia. Caracteriza-se pela elevação do colesterol plasmático levado pela LDL, a principal proteína de transporte do colesterol no plasma. A doença deve-se a mutações no gene estrutural que codifica o receptor de LDL, uma proteína de superfície celular responsável pela ligação de LDL e por seu encaminhamento para o interior da célula. Tanto os heterozigotos quanto os homozigotos desenvolvem doença cardíaca prematura em conseqüência de ateromas (depósitos de colesterol derivado de LDL nas artérias coronarianas), xantomas (depósitos de colesterol na pele e tendões; ver Fig. 5.13) e *arcus corneae* (depósitos de colesterol ao redor da periferia da córnea). Poucas doenças foram tão bem caracterizadas. A seqüência de eventos patológicos do locus afetado até seu efeito nas pessoas e populações foi bem documentada.

Genética. A hipercolesterolemia familiar é herdada como uma característica autossômica dominante. São conhecidos tanto fenótipos homozigotos quanto heterozigotos, e um claro efeito de dosagem gênica é evidente: a doença manifesta-se mais cedo e de forma mais grave nos homozigotos que nos heterozigotos (ver Fig. 5.13), refletindo a maior redução no número de receptores de LDL e a maior elevação de colesterol LDL no plasma (Fig. 12.10). Os homozigotos podem ter doença cardíaca coronariana clinicamente significativa na infância, e poucos vivem além da terceira década. Embora a forma homozigota seja rara (1 pessoa em 1 milhão), a forma heterozigota, com uma freqüência populacional de pelo menos 1 em 500, é um dos distúrbios monogênicos humanos mais comuns. Os heterozigotos têm níveis de colesterol plasmático que são cerca do

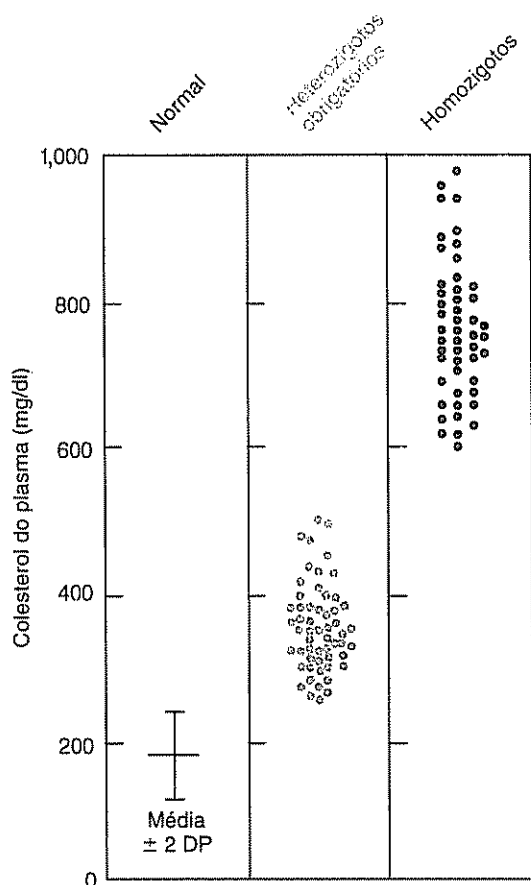



Fig. 12.10 Dosagem gênica na deficiência de lipoproteína de baixa densidade (LDL): a distribuição dos níveis totais de colesterol do plasma em 49 pacientes homozigotos para a deficiência de receptor de LDL, em seus genitores (heterozigotos obrigatórios), e em controles normais (Redesenhado de Goldstein J L, Brown M S [1989] Familial hypercholesterolemia *In* Scriver C R, Beaudet A L, Sly W. S, Valle D [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease. 6ª ed McGraw-Hill. New York. pp 1 215-1 250)

dobro dos controles (Fig. 12.10). Devido à natureza genética da hipercolesterolemia familiar, é importante fazer o diagnóstico nos cerca de 5% dos sobreviventes de infartos que são heterozigotos para um defeito do receptor de LDL. Entretanto, apenas cerca de 1 em 20 pessoas da população em geral com aumento de colesterol plasmático e um padrão de hiperlipoproteína tipo 2 tem hipercolesterolemia familiar, enquanto a maioria tem uma hipercolesterolemia não-caracterizada de origem multifatorial.

Captação de Colesterol pelo Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade. As células normais obtêm colesterol, um componente essencial das membranas e precursor de hormônios esteróides e sais biliares, seja por síntese *de novo* ou por captação do plasma de colesterol exógeno ligado à LDL. O processo de captação é mediado pelo receptor da LDL, que reconhece a apoproteína B-100, a fração protéica da LDL. Os receptores de LDL na superfície celular estão localizados em depressões revestidas delimitadas pela proteína clatrina (Fig. 12.11). A LDL ligada ao receptor é levada para a célula pela invaginação das depressões revestidas, que ao final se unem a lisossomos onde a LDL é hidrolisada para liberar colesterol livre. O aumento de colesterol intracelular livre reduz a formação de colesterol endógeno pela supressão da enzima limitadora de velocidade da via sintética (3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, ou HMG CoA redutase). O colesterol desnecessário para o metabolismo celular ou a síntese da membrana pode ser reesterificado para armazenamento como ésteres de colesterol, um processo estimulado pela ativação de acil CoA: colesterol aciltransferase (ACAT). O aumento de colesterol também reduz a síntese do receptor (Fig. 12.11)

O receptor maduro de LDL tem cinco domínios estruturais distintos que, em sua maior parte, têm funções distintas. Algumas destas regiões são codificadas por éxons únicos ou por grupos de éxons que codificam regiões que são homólogas a domínios em outros polipeptídeos (Fig. 12.12). A análise do efeito das mutações no receptor nos vários domínios teve uma parte importante no estabelecimento de muitos dos domínios. Estes estudos exemplificam a importante contribuição que a análise genética pode ter na determinação da relação estrutura-função de uma proteína.

Classes de Mutações no Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade

Foram identificadas mais de 400 mutações diferentes no gene do receptor de LDL, mutações estas que estão distribuídas pela seqüência. Dezesseis por cento de todas as mutações documentadas são grandes rearranjos estruturais, mas, como é o caso em muitos loci, este tipo de mutação é responsável apenas por 2% a 10% dos alelos do receptor de LDL na maioria das populações. Os alelos restantes são substituições de um único nucleotídeo, pequenas inserções ou deleções. Em algumas populações endogâmicas, alelos específicos podem contribuir para uma grande fração das mutações, o que provavelmente reflete um efeito do fundador (ver Cap. 7).

As culturas de fibroblastos dos pacientes afetados têm sido usadas para caracterizar os receptores mutantes e os distúrbios resultantes no metabolismo de colesterol. As mutações no gene do receptor de LDL podem ser agrupadas em cinco classes, dependendo de qual etapa do itinerário celular normal do receptor foi prejudicada pela mutação (ver Fig. 12.11). As **mutações classe 1** são alelos nulos que evitam a síntese de qualquer receptor detectável. Elas são o tipo mais comum de mutações causadoras de doenças neste locus. Alguns alelos classe 1 são decorrentes de deleções, enquanto outros produzem quantidades normais de mRNA para receptor de LDL e supostamente têm defeitos que impedem a formação ou a estabilidade do polipeptídeo. Nas quatro classes restantes, o receptor é sintetizado normalmente, mas seu funcionamento está prejudicado.

As mutações nas classes 2 e 4 (ver Fig. 12.11) definem características do polipeptídeo cruciais para sua localização subcelular. As **mutações classe 2**, relativamente comuns, são chamadas de *deficientes de transporte* porque os receptores de LDL se acumulam no sítio de sua síntese, o retículo endoplasmático, em vez de serem transportados para o complexo de Golgi. Supõe-se que estes alelos impeçam o dobramento apropriado da proteína, aparentemente um requisito para a saída do retículo endoplasmático.

Os **receptores mutantes classe 3** atingem a superfície celular, mas são incapazes de ligar LDL (ver Fig. 12.11). Conseqüentemente, estes alelos permitiram que os pesquisadores identificassem o domínio de ligação de LDL (ver Fig. 12.12). Em um mutante deste tipo, um crossing desigual decorrente de desali-

Classe de mutante: *Evento perturbado por mutação:*
Classe 1 Síntese de receptor
Classe 2 Transporte de receptor RE → Golgi
Classe 3 Ligação de LDL ao receptor
LDL do plasma
Apoproteína B-100
Colesteril éster
Receptor maduro de LDL
Vesícula
Complexo de Golgi
Retículo endoplasmático
Depressão revestida
Vesícula revestida
Classe 4 Agrupamento de receptores na depressão revestida
A) ↓ síntese de receptor de LDL
B) ↓ HMG CoA redutase
C) ↑ ACAT
Lisossomo
H^+
Endossomo
Colesterol livre
Gotículas de colesteril éster
Aminoácidos
Classe 5 Falta de descarga de LDL no endossomo (defeito de reciclagem)
Reciclagem de vesícula

Fig. 12.11 A biologia celular e o papel bioquímico do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e as cinco classes de mutações que alteram sua função. Após a síntese no retículo endoplasmático, o receptor é transportado para o aparelho de Golgi e, subseqüentemente, para a superfície celular. Os receptores normais estão localizados nas depressões revestidas por clatrina, que se invaginam, criando vesículas revestidas e então endossomos, os precursores dos lisossomos. Normalmente, o acúmulo intracelular de colesterol livre é evitado porque o aumento de colesterol livre (A) diminui a formação de receptores de LDL, (B) reduz a síntese *de novo* de colesterol e (C) aumenta o armazenamento de colesteril ésteres. O fenótipo bioquímico de cada classe de mutação é discutido no texto. (Modificado de Brown M S., Goldstein J L. [1985] The LDL receptor and HMG-CoA reductase — two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis. Curr Top Cell Regul 26:3-15.)

nhamento e recombinação entre as seqüências de repetição *Alu* deletou parte do domínio de ligação de LDL. A recombinação homóloga desigual entre duas cópias de uma seqüência repetitiva de DNA foi vista como uma causa freqüente de deleções tanto neste gene quanto nos outros (ver Cap. 6).

As **mutações classe 4** prejudicam a localização do receptor na depressão revestida e, conseqüentemente, o LDL ligado não é internalizado (ver Fig. 12.11). Estas mutações alteram ou retiram o domínio citoplasmático no terminal carboxila do receptor, demonstrando que normalmente esta região endereça o receptor para a depressão revestida. Acredita-se que um destes alelos, uma substituição de tirosina por cisteína no éxon 17 (ver Fig. 12.12), altere a conformação do domínio citoplasmático do receptor, interferindo, assim, na ligação à proteína que direciona a incorporação à depressão revestida.

As **mutações classe 5** são alelos com defeito de reciclagem (ver Fig. 12.11). A reciclagem dos receptores requer a dissociação do receptor e do LDL ligado no endossomo. A dissociação é mediada pelo domínio de homologia do precursor do fator de crescimento epidérmico (ver Fig. 12.12). As mutações neste domínio, ambas deleções de segmentos dele, bem como algumas substituições de sentido trocado, impedem a liberação do ligando. Esta falha leva à degradação do receptor, supostamente porque ele não pode retornar para a superfície da célula em um estado desocupado.

Patogenia das Placas Ateroscleróticas na Hipercolesterolemia Familiar. A despeito do grande conhecimento da biologia normal dos receptores de LDL e de seus defeitos moleculares na hipercolesterolemia familiar, os mecanismos pelos quais a elevação de LDL leva à formação das placas ateroscleróticas nas artérias não estão claros. Nos homozigotos, o aumento de LDL é eliminado do líquido extracelular por vias *independentes de receptor*, incluindo a captação por células removedoras, tais como os macrófagos. Os estudos de macrófagos *in vitro* mostram que o excesso de colesterol é estocado como gotículas de colesterol éster, produzindo o aspecto de célula espumosa tipicamente visto nos xantomas e nas placas ateroscleróticas, mas no momento a relevância *in vivo* deste trabalho é incerta.

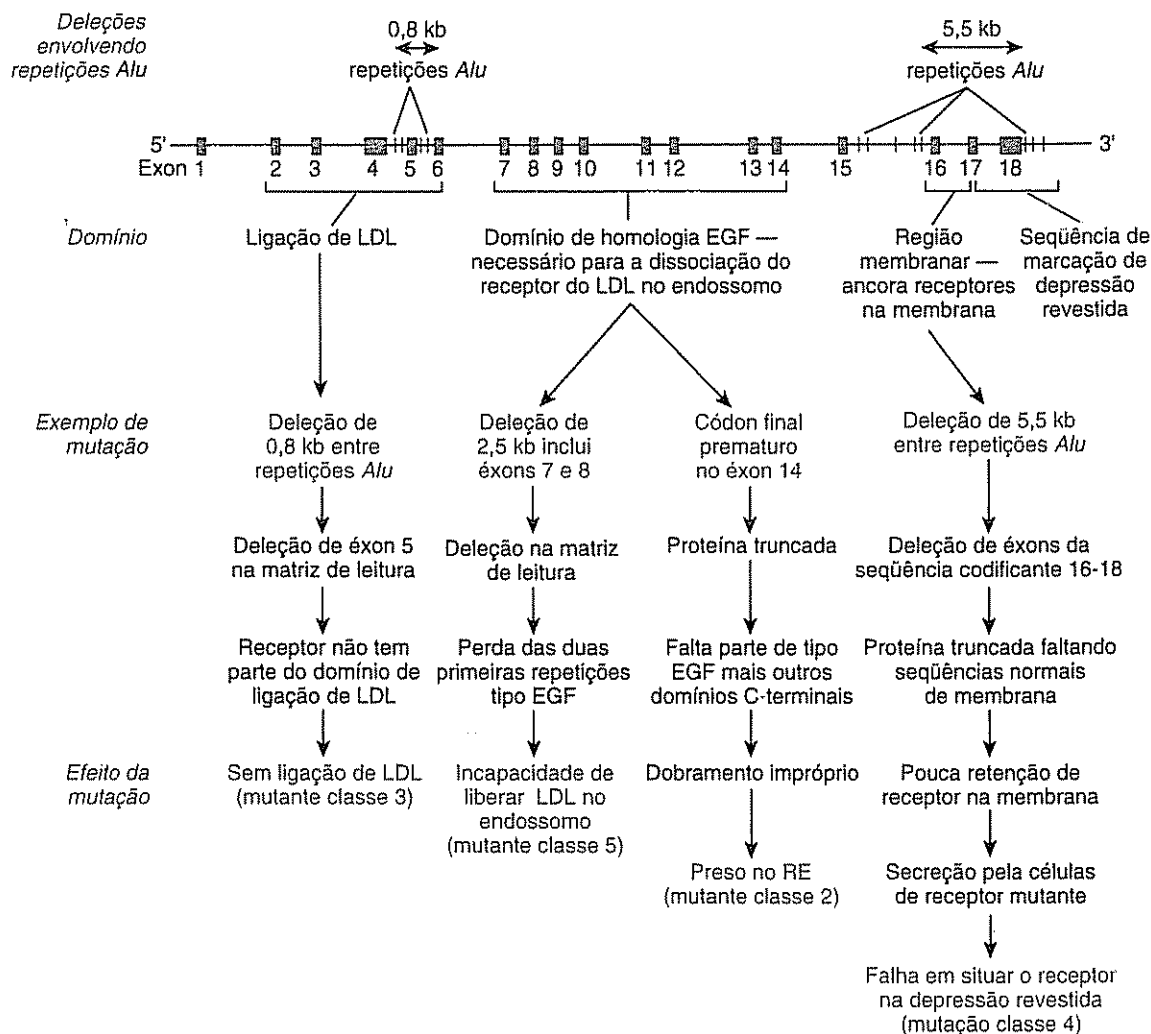



Fig. 12.12 A estrutura do gene receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) mostrando seus cinco domínios e a localização de mutações selecionadas que levam à hipercolesterolemia familiar. O tamanho de várias deleções é indicado pelas barras horizontais acima do gene (*com éxons indicados em vermelho*). EGF = domínio de homologia do precursor do fator de crescimento epidérmico. RE = retículo endoplasmático. Os éxons, íntrons e repetições *Alu* estão apenas aproximadamente em escala. (Modificado de Goldstein J. L., Brown M. S. [1989] Familial hypercholesterolemia. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease. 6.ª ed. McGraw-Hill. New York. pp. 1 215-1 250.)

DEFEITOS DE TRANSPORTE

Fibrose Cística

Desde a década de 1960, a CF tem sido a mais pública de todas as doenças genéticas humanas. É o distúrbio genético autossômico recessivo fatal mais comum de crianças nas populações caucasianas, com uma incidência de aproximadamente 1 em 2.500 nascimentos de caucasianos e uma freqüência de portadores de cerca de 1 em 25. A clonagem posicional (ver Cap. 8) do gene CF (chamado *CFTR*) em 1989 juntamente com o isolamento do gene da distrofia muscular Duchenne três anos antes foram os primeiros frutos importantes da promessa de que a biologia molecular colocaria os genes envolvidos nas doenças hereditárias nas mãos dos cientistas médicos, mesmo que inicialmente não se soubesse nada sobre a localização do locus afetado ou a função de seu produto normal. Logo após o gene ser clonado, as análises fisiológicas demonstraram que a proteína codificada pelo gene *CFTR* é um canal de Cl^- situado na membrana apical das células epiteliais afetadas pela doença.

Os Fenótipos da Fibrose Cística. Os pulmões e o pâncreas exócrino são os principais órgãos afetados pela doença, mas uma importante característica diagnóstica é o aumento das concentrações de Na^+ e Cl^- no suor (o que em geral é inicialmente observado quando os pais beijam seus filhos). Na maioria dos pacientes com CF, o diagnóstico pode ser baseado em achados pulmonares ou pancreáticos e no nível elevado de cloreto no suor (mais de 60 mEq/l). Menos de 2% dos pacientes têm cloreto normal no suor, mas apresentam um quadro clínico típico. Nestes casos, a análise molecular pode ser usada para avaliar se eles têm mutações no locus CF.

A doença pulmonar obstrutiva crônica desenvolve-se como um resultado de secreções espessas e infecções recorrentes, e as deficiências de enzimas pancreáticas (lipase, tripsina, quimotripsina) impedem a digestão normal. O intenso tratamento da doença pulmonar prolonga a vida, e a digestão e a nutrição podem ser amplamente restauradas por suplementos de enzimas pancreáticas. A morte resulta de insuficiência pulmonar e infecções. No momento, cerca de metade dos pacientes sobrevive até os 26 anos de idade, mas o curso clínico é variável. Cerca de 15% dos paci-

entes com CF têm função exócrina pancreática residual suficiente para a digestão normal e são chamados de *suficientes pancreáticos*. Além disso, os pacientes com CF que são suficientes pancreáticos têm melhor crescimento e funcionamento pulmonar, bem como um prognóstico geral superior aos *insuficientes pancreáticos*, que são maioria. A heterogeneidade clínica da doença pancreática é, pelo menos em parte, decorrente de heterogeneidade alélica, como será discutido mais adiante.

Muitos outros fenótipos são observados em pacientes com CF. Por exemplo, a obstrução pós-natal do trato intestinal inferior (**mecônio íleo**) ocorre em 10% a 20% dos neonatos com CF. Sua presença requer que o diagnóstico de CF seja excluído. O trato genital também é afetado. Embora as mulheres com CF tenham alguma redução da fertilidade, mais de 95% dos homens com CF são inférteis porque não têm *vas deferens*, um fenótipo conhecido como **ausência bilateral congênita de *vas deferens*** (CBAVD). Em um marcante exemplo de heterogeneidade alélica que origina um fenótipo parcial, observou-se que alguns homens inférteis que sob outros aspectos estão bem (não têm outros fenótipos de CF) têm CBAVD associada a alelos mutantes específicos no gene CF. Similarmente, algumas pessoas com **pancreatite crônica idiopática** possuem mutações no gene CF, embora não tenham outros sinais clínicos de CF.

O Gene de Fibrose Cística e a Proteína Cftr. O gene CF no cromossomo 7q31 tem cerca de 250 kb de DNA, e a região codificante, com 27 éxons, é prevista codificando uma grande proteína integrante da membrana com cerca de 170 kD (Fig. 12.13). Com base nas anomalias fisiológicas do transporte transmembranar de íons observado na CF, o polipeptídeo codificado pelo gene da CF foi chamado de proteína cftr (regulador de condutância transmembranar de CF). Sua seqüência primária de aminoácidos indica que ela pertence à família ABC (ATP [trifosfato de adenosina]-cassete de ligação) de proteínas de transporte. Demonstrou-se que pelo menos sete outras doenças resultam da perda de função de transportadores ABC específicos.

O canal cftr Cl^- é caracterizado por cinco domínios, mostrados na Fig. 12.13: dois domínios membranares (MSDs), cada um com seis seqüências transmembranares, dois domínios de ligação-(ATP) de nucleotídeo (NBDs) e um domínio regulador (R) com múltiplos sítios de fosforilação. A importância de cada domínio é demonstrada pela identificação de mutações de sentido trocado causadoras de CF em cada um deles (Fig. 12.13). O poro do canal Cl^- é formado por 12 segmentos transmembranares. O ATP é ligado e hidrolisado por NBDs, e a energia liberada é usada para o transporte de íons. A regulação do canal é mediada, pelo menos em parte, pela fosforilação do domínio R.

Defeitos Fisiopatológicos na Fibrose Cística. Como manifestado pelo aumento dos níveis de Na^+ e Cl^-, a CF é devida ao transporte anormal de eletrólitos através das membranas epiteliais apicais. Esta anomalia leva à patologia nos pulmões, no pâncreas, no intestino, na árvore hepatobiliar e no trato genital masculino. As anomalias fisiológicas foram mais claramente elucidadas para as glândulas sudoríparas: a perda de função de cftr significa que o Cl^- no duto da glândula sudorípara não pode fluir pela luz e através das células do duto para a corrente sanguínea. Em conseqüência, o gradiente eletroquímico que normalmente ativa a entrada de Na^+ através da membrana apical está ausente ou diminuído, o que leva a um aumento secundário na

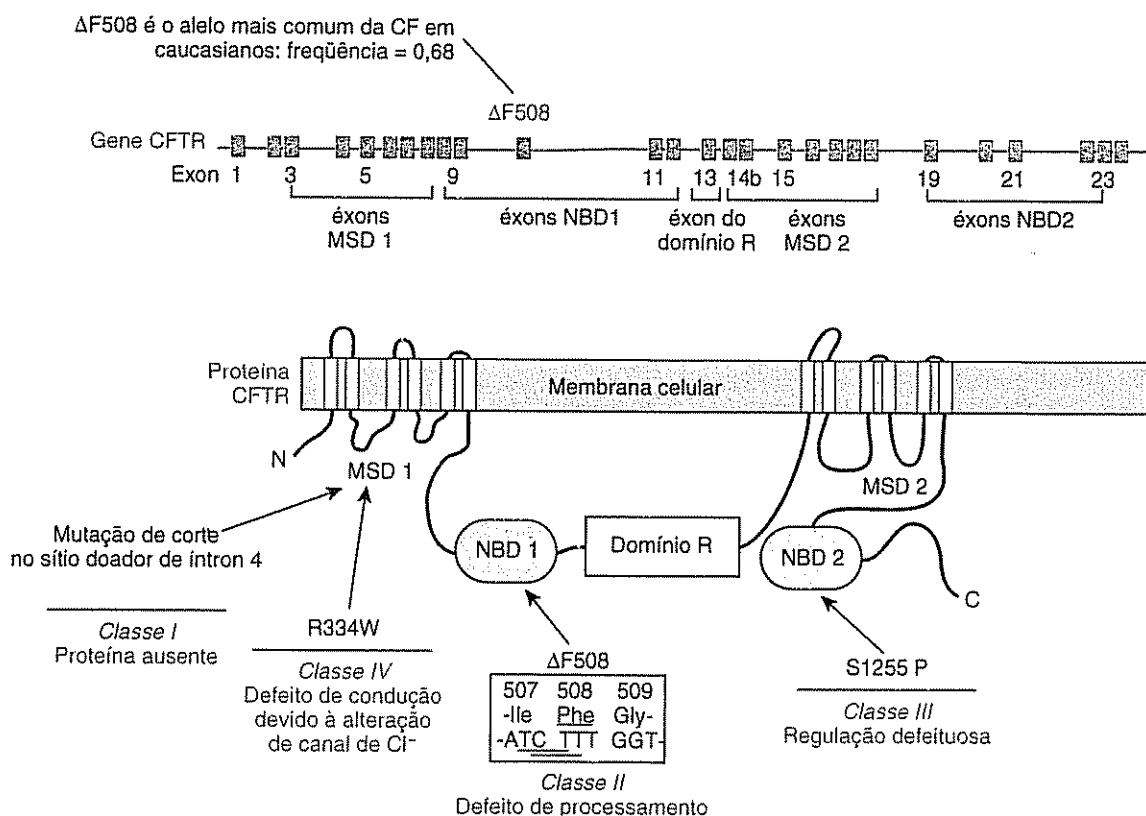



Fig. 12.13 A estrutura do gene *CFTR* e um esquema da proteína cftr. São mostradas mutações selecionadas. Os éxons, íntrons e domínios da proteína não estão desenhados em escala. (Baseado em Zielinski J [2000] Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 67:117-133.)

concentração de Na^+ na luz do duto sudoríparo. Os efeitos no transporte de eletrólitos devidos a anomalias na proteína cftr também foram cuidadosamente estudados no epitélio das vias aéreas e pancreático. Em cada caso, o defeito fundamental está no transporte de Cl^-, mas os processos gerais são complexos, incompletamente compreendidos e estão além do escopo desta discussão.

A Genética da Fibrose Cística

Mutações no Polipeptídeo Cftr. A primeira mutação de CF identificada, uma deleção de uma fenilalanina na posição 508 (Δ*F508*) na primeira dobra de ligação de ATP (NBD1; Fig. 12.13), é o defeito mais comum, contribuindo com cerca de 70% de todos os alelos CF nas populações caucasianas. Nestas populações, apenas outras sete mutações são mais freqüentes que 0,5% e, portanto, a maioria é rara. Foram identificadas mutações de todos os tipos, mas o maior grupo isolado (quase metade) é de substituições de sentido trocado. O restante são mutações de ponto de outros tipos, e menos de 1% são rearranjos genômicos. Embora mais de 800 mudanças de seqüências do gene CF tenham sido associadas à doença, o número real de mutações de sentido trocado causadoras de doença ainda é incerto, pois poucas foram submetidas à análise funcional.

Embora as anomalias bioquímicas associadas a maioria das mutações CF não sejam conhecidas, quatro mecanismos gerais de disfunção proteica foram descritos. Os alelos representativos de cada uma destas quatro classes são mostrados na Fig. 12.13. As mutações de classe I são as que têm um defeito na produção da proteína, tais como as associadas a códons finalizadores prematuros ou mutações que geram RNAs instáveis. Como a cftr é uma proteína glicosilada da membrana, ela deve ser processada no retículo endoplasmático (RE) e Golgi para ser glicosilada e secretada. As mutações da classe II são o resultado de processamento proteico defeituoso decorrente de mau dobramento da proteína. O mutante Δ*F508* tipifica esta classe. Este mutante não se dobra normalmente o suficiente para permitir sua saída do RE.

As funções essenciais de NBDs e o domínio R (Fig. 12.13) são ilustrados pela ocorrência das mutações causadoras de CF que perturbam a regulação da proteína (mutações classe III). As mutações classe IV estão situadas em MSDs e, compatível com esta localização, têm condução defeituosa de cloreto.

Correlações Genótipo-fenótipo na Fibrose Cística. Como todos os pacientes com CF parecem ter mutações no gene CF, a heterogeneidade clínica na CF deve surgir da heterogeneidade alélica, de efeitos de outros loci modificadores ou de fatores não-genéticos. Surgiram duas generalizações da análise genética e clínica dos pacientes CF. Primeiro, o genótipo *CFTR* é um bom previsor do funcionamento pancreático. Por exemplo, os pacientes homozigotos para a mutação comum Δ*F508* ou os previstos alelos nulos (tais como códons finalizadores prematuros) em geral têm insuficiência pancreática (Quadro 12.7). Por outro lado, os alelos que permitem a síntese de uma proteína cftr parcialmente funcional, tal como Arg334Trp (ver Fig. 12.13), tendem a estar associados à suficiência pancreática. Segundo, há pouca correlação geral entre o fenótipo pulmonar e o genótipo *CFTR*. Por exemplo, entre os pacientes homozigotos para a mutação Δ*F508*, a gravidade da doença pulmonar é muito variável. Os motivos desta pobre correlação pulmonar genótipo-fenótipo não estão claros. Não foram identificados genes modificadores para o fenótipo pulmonar. Um locus modificador para o fenótipo intestinal mecônio íleo da CF foi mapeado no cromossomo 19q13, mas o gene ainda não foi identificado.

O Gene da Fibrose Cística nas Populações. No momento, não é possível explicar a alta freqüência alélica da CF de 1 em 45 que é observada nas populações caucasianas (ver Cap. 7). A doença é muito menos freqüente em não-caucasianos, embora tenha sido relatada em americanos nativos, afro-americanos e asiáticos (cerca de 1 em 90.000 havaianos de descendência asiática). O alelo Δ*F508* é o único encontrado até hoje que é comum em quase todas as populações caucasianas. A análise de haplótipos de populações caucasianas indica que o alelo Δ*F508* tem uma só origem. A freqüência deste alelo, entre todos os alelos mutantes, varia significativamente em diferentes populações européias, desde 88% na Dinamarca até 45% no sudeste da Itália.

Nas populações nas quais a freqüência do alelo Δ*F508* é de aproximadamente 70% de todos os alelos mutantes, cerca de 50% dos pacientes são homozigotos para o alelo Δ*F508*, e 40% adicionais têm genótipos compostos genéticos para Δ*F508* e outro alelo mutante. Além disso, aproximadamente 70% dos portadores de CF têm a mutação Δ*F508*. Exceto para Δ*F508*, as mutações no locus *CFTR* são raras, embora em populações específicas outros alelos possam ser bem comuns.

Triagem Populacional. As complexas questões que são levantadas na consideração da triagem populacional para doenças tais como a CF serão discutidas no Cap. 20. No momento, a CF atende a maioria dos critérios para um programa de triagem neonatal, exceto pelo fato de ainda não estar claro se a triagem melhora significativamente o prognóstico a longo prazo. Em geral é aceito que a triagem universal não deve ser considerada até que

QUADRO 12–7

O Fenótipo da Fibrose Cística Associado a ΔF508 *Versus* Outros Alelos

	ΔF508/ΔF508	ΔF508/Outro Alelo	Outro Alelo/Outro Alelo
Número de pacientes	151	117	25
% de todos os pacientes	52%	40%	8%
% com PI	99%	72%	36%
% com PS	1%	28%	64%
Idade do diagnóstico (± DP)	1,8 ± 3,3 anos	4,4 ± 5,9 anos	8,4 ± 8,3 anos

PI = insuficiência pancreática; PS = suficiência pancreática
Adaptado de Kerem E., Corey M., Kerem B-S., *et al.* (1990) The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis: Analysis of the most common mutation (ΔF508). N Engl J Med 323:1517-1522

pelo menos 95% das mutações possam ser detectadas nos portadores. O fato de que muitas mutações raras constituem mais de 5% das mutações na maioria das populações é um sério obstáculo à triagem.

Análise Genética de Famílias de Pacientes e Diagnóstico Pré-natal. A alta freqüência do alelo $\Delta F508$ é útil quando os pacientes CF sem uma história familiar se apresentam para um diagnóstico de DNA. A identificação do alelo $\Delta F508$, em combinação com a análise de haplótipos, pode ser usada para prever a situação dos membros familiares para (1) a confirmação da condição da doença (p. ex., em um neonato ou um irmão com apresentação ambígua), (2) a detecção de portador e (3) o diagnóstico pré-natal. Tendo em vista o grande conhecimento das mutações CF em muitas populações, a detecção direta da mutação é o método de escolha para a análise genética. Tipicamente, a triagem é feita para 10 a 30 das mutações mais comuns encontradas na região geográfica de origem da família em questão. Em princípio, é possível um diagnóstico preciso em absolutamente todas as famílias.

Para fetos com um risco de 1 em 4, o diagnóstico pré-natal por análise de DNA entre 8 e 10 semanas, com tecido obtido de biópsia de vilosidades coriônicas, é o método de escolha (ver Cap. 18). Os métodos bioquímicos de diagnóstico pré-natal baseados na dosagem de enzimas intestinais (p. ex., fosfatase alcalina) no líquido amniótico também são razoavelmente precisos, com uma taxa de falso positivo de 2% a 5% e taxa de falso negativo de 2% a 10%. Este método agora é usado apenas quando o caso índice não está disponível ou quando o tempo para fazer os estudos mutacionais ou de ligação genética na família é insuficiente.

Genética Molecular e o Tratamento da Fibrose Cística. No momento, o tratamento da CF é dirigido para o controle da infecção pulmonar e a melhoria nutricional. Um maior conhecimento da patogenia molecular pode possibilitar o planejamento de intervenções farmacológicas que iriam corrigir diretamente o fenótipo bioquímico anormal. Alternativamente, a terapia de transferência gênica pode ser possível na CF, mas existem muitas dificuldades, como será discutido no Cap. 13.

Fig. 12.14 Pseudo-hipertrofia das panturrilhas decorrente de substituição de tecido muscular normal por tecido conjuntivo e gordura em um menino de 8 anos com distrofia muscular Duchenne (Cortesia de R. H. A. Haslam, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

DISTÚRBIOS DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

Distrofias Musculares Duchenne e Becker: Defeitos na Distrofina

Como a CF, a DMD tem recebido muita atenção tanto da comunidade em geral quanto da comunidade médica porque é um distúrbio grave, até o momento sem tratamento e relativamente comum, associado a uma deterioração clínica progressiva. O isolamento do gene afetado neste distúrbio ligado ao X e a caracterização de sua proteína (chamada de "distrofina" devido à sua associação à DMD) têm dado informações sobre cada aspecto da doença, informação genética melhorada às famílias afetadas e sugestões de tratamento.

O Fenótipo Clínico da Distrofia Muscular Duchenne. Os meninos afetados são normais no primeiro ou nos dois primeiros anos de vida, mas desenvolvem uma fraqueza muscular no período de 3 a 5 anos (Fig. 12.14), quando começam a ter dificuldade para subir escadas e se levantar de uma posição sentada. A criança fica confinada a uma cadeira de rodas por volta dos 12 anos e sua sobrevida além dos 20 anos é improvável. Os pacientes morrem de insuficiência respiratória ou de insuficiência cardíaca, uma vez que o músculo cardíaco também está afetado. Nos estágios pré-clínico e inicial da doença, o nível de creatina cinase sérica está muito elevado (de 50 a 100 vezes o limite superior do normal) em função de sua liberação pelo músculo afetado. O cérebro também é afetado e em média há uma pequena diminuição de QI de cerca de 20 pontos.

Distrofia Muscular Becker. A BMD também se deve a mutações no gene de distrofina, mas os alelos Becker produzem um fenótipo que é muito mais brando. Diz-se que os pacientes têm BMD se eles ainda estiverem andando aos 16 anos de idade. Há uma variabilidade significativa na progressão da doença, e alguns pacientes continuam andando por muitos anos. Em geral, os pacientes com BMD têm alelos mutados que conservam a matriz de leitura da proteína e assim expressam alguma distrofina, embora em geral um produto alterado em níveis reduzidos. A presença da distrofina no músculo dos pacientes BMD em geral é demonstrável nas transferências Western (ver Fig. 4.14) e por imunofluorescência (Fig. 12.15). Em contraste, os pacientes com DMD têm pouca ou nenhuma distrofina detectável usando ambas as técnicas.

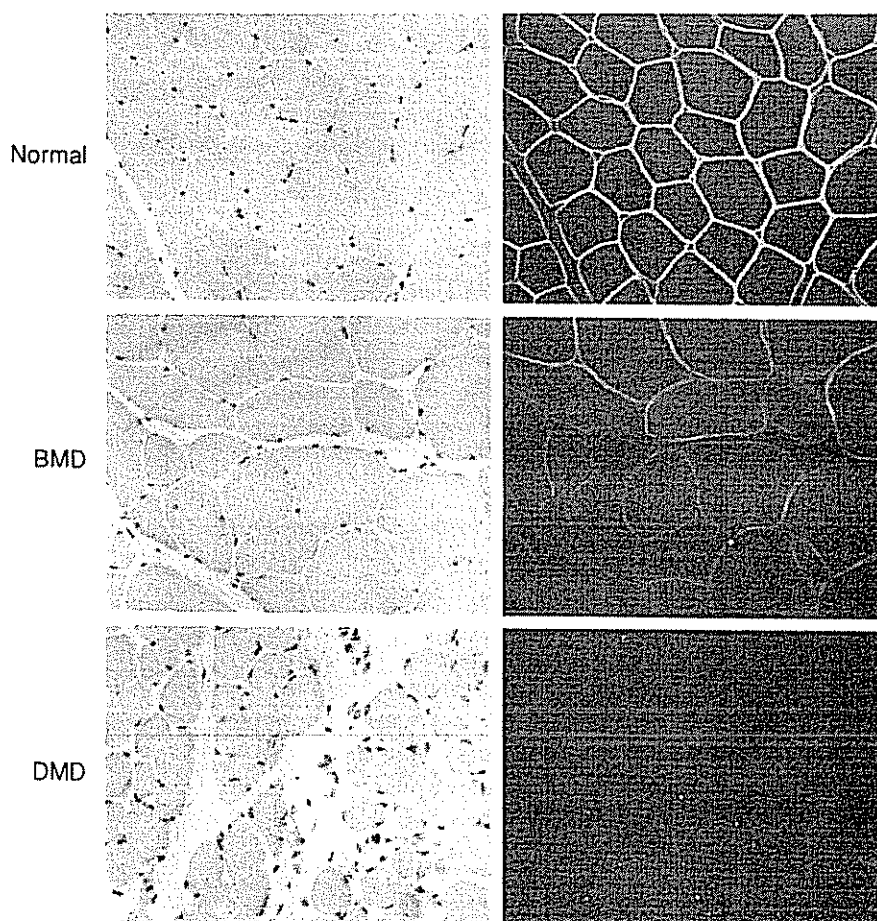



Fig. 12.15 Visualização microscópica do efeito das mutações no gene de distrofina em um paciente com distrofia muscular Becker (BMD) e um paciente com distrofia muscular Duchenne (DMD). Coluna da esquerda = coloração do músculo com hematoxilina e eosina. Coluna da direita = microscopia de imunofluorescência com coloração de um anticorpo específico para distrofina. Notar a localização da distrofina na membrana do miócito no músculo normal, a quantidade reduzida no músculo com distrofina BMD e a ausência total de distrofina nos miócitos do músculo com DMD. A quantidade de tecido conjuntivo entre os miócitos no músculo DMD está aumentada. (Cortesia de K. Arahata, National Institute of Neuroscience, Tokyo.)

A Genética da Distrofia Muscular Duchenne e da Distrofia Muscular Becker

Herança. A DMD tem uma incidência de cerca de 1 em 3 300 nativivos masculinos, com uma taxa de mutação calculada em 10^{-4}, uma ordem de grandeza maior que a taxa observada em genes envolvidos na maioria das outras doenças genéticas. Na verdade, considerando-se uma produção de cerca de 8×10^7 espermatozóides por dia, um homem normal produz um espermatozóide com uma nova mutação no gene *DMD* a cada 10 a 11 segundos! No Cap. 5, a DMD foi apresentada como um típico recessivo ligado ao X que é letal nos homens, de modo que se prevê que um terço dos casos seja de mutantes novos e dois terços dos pacientes tenham mães portadoras (ver também Cap. 19). A grande maioria das mulheres portadoras não tem manifestações clínicas, embora 70% tenham níveis levemente elevados de creatina cinase sérica. De acordo com a inativação aleatória do cromossomo X (ver Cap. 5), entretanto, o cromossomo X normal parece ser inativado em uma proporção crítica das células em algumas mulheres heterozigotas. Cerca de 8% das mulheres portadoras adultas têm fraqueza muscular significativa e, em alguns casos, grave incapacidade muscular proximal. Em raros casos, mulheres foram relatadas com DMD (Quadro 12.8). Algumas têm translocações X; autossomo (ver Cap. 10), outras têm apenas um cromossomo X (síndrome de Turner) com uma mutação *DMD* neste cromossomo e um grupo raro consiste em gêmeas monozigóticas heterozigotas.

A BMD corresponde a cerca de 15% das mutações no locus. Uma importante distinção genética entre estes fenótipos alélicos é que enquanto a DMD é um letal genético, a adaptabilidade reprodutiva dos homens com BMD é bem alta (até cerca de 70% do normal), de modo que podem transmitir o gene para suas filhas. Conseqüentemente, uma alta proporção de casos de BMD é herdada, e alguns (apenas cerca de 10%) representam mutações novas.

O Gene DMD e Seu Produto. A característica mais marcante do gene *DMD* é seu tamanho, avaliado como sendo de 2.300 kb, ou 1,5% do cromossomo X. Este gene enorme, como o gene para a neurofibromatose tipo 1 (NF1) e alguns outros, é o maior conhecido em qualquer espécie, em ordem de magnitude. A alta taxa de mutação pode, portanto, ser explicada em parte pelo fato de que o locus é um alvo grande para mutação. O gene *DMD* é estruturalmente complexo, com 79 éxons, 7 promotores histoespecíficos e recomposição diferencial, originando isoformas histoespecíficas reguladas no desenvolvimento. No músculo, o sítio primário de patologia, o grande transcrito de distrofina (14 kb), codifica uma

QUADRO 12–8

Mecanismos de Mutação na Distrofia Muscular Duchenne ou Becker

Defeito Molecular ou Genético	Freqüência	Fenótipo
Em homens afetados:		
Deleção gênica (1 éxon a todo o gene)	~60%	DMD ou BMD
Mutações de ponto	~34%	DMD ou BMD
Duplicação parcial do gene	~6%	DMD ou BMD
Deleção de genes contíguos	Rara	DMD mais outros fenótipos, dependendo de outros genes deletados
Em mulheres afetadas:		
Inativação não-aleatória do X	Rara	DMD
Síndrome de Turner (45, X)	Rara	DMD
Translocação X;autossomo	Rara	DMD

BMD = distrofia muscular Becker; DMD = distrofia muscular Duchenne.

enorme proteína com 427 kD (Fig. 12.16). Em concordância com o fenótipo clínico da doença, esta proteína é mais abundante nos músculos esqueléticos, cardíaco e no cérebro, embora a maioria dos tecidos expresse pelo menos uma isoforma de distrofina.

A distrofina muscular tem vários domínios homólogos a outras proteínas do citoesqueleto (Fig. 12.16 e Fig. 12.17). A distrofina parece ser uma proteína estrutural, com pelo menos dois papéis principais. Primeiro, é essencial para a manutenção da integridade da mebrana muscular, ligando a actina do citoesqueleto à matriz extracelular. Segundo, ela parece ser necessária para a montagem da junção sináptica, pois os membros do complexo transmembranar participam do aglomerado do receptor de acetilcolina durante o desenvolvimento. Como indicado na Fig. 12.17, as mutações em outras proteínas no complexo de glicoproteína da distrofina são responsáveis pelas formas autossômicas recessivas de distrofia muscular similares à Duchenne, distrofia muscular da cintura dos membros e outras distrofias.

Análise Molecular da Distrofia Muscular Duchenne e da Distrofia Muscular Becker. Os defeitos moleculares mais comuns nos pacientes com DMD são as deleções (60% dos alelos) (ver Quadro 12.8, Fig. 12.16 e Fig. 12.18). A distribuição das deleções no gene não é aleatória. Elas estão aglomeradas em uma ou duas regiões dentro do gene, na metade 5' ou na região central que parece incluir um ponto quente de deleção (ver Fig. 12.16). As deleções centrais supostamente resultam de um desalinhamento de pareamento descrito na Fig. 11.8. As mutações de ponto contribuem com cerca de um terço dos alelos e estão distribuídas aleatoriamente pelo gene.

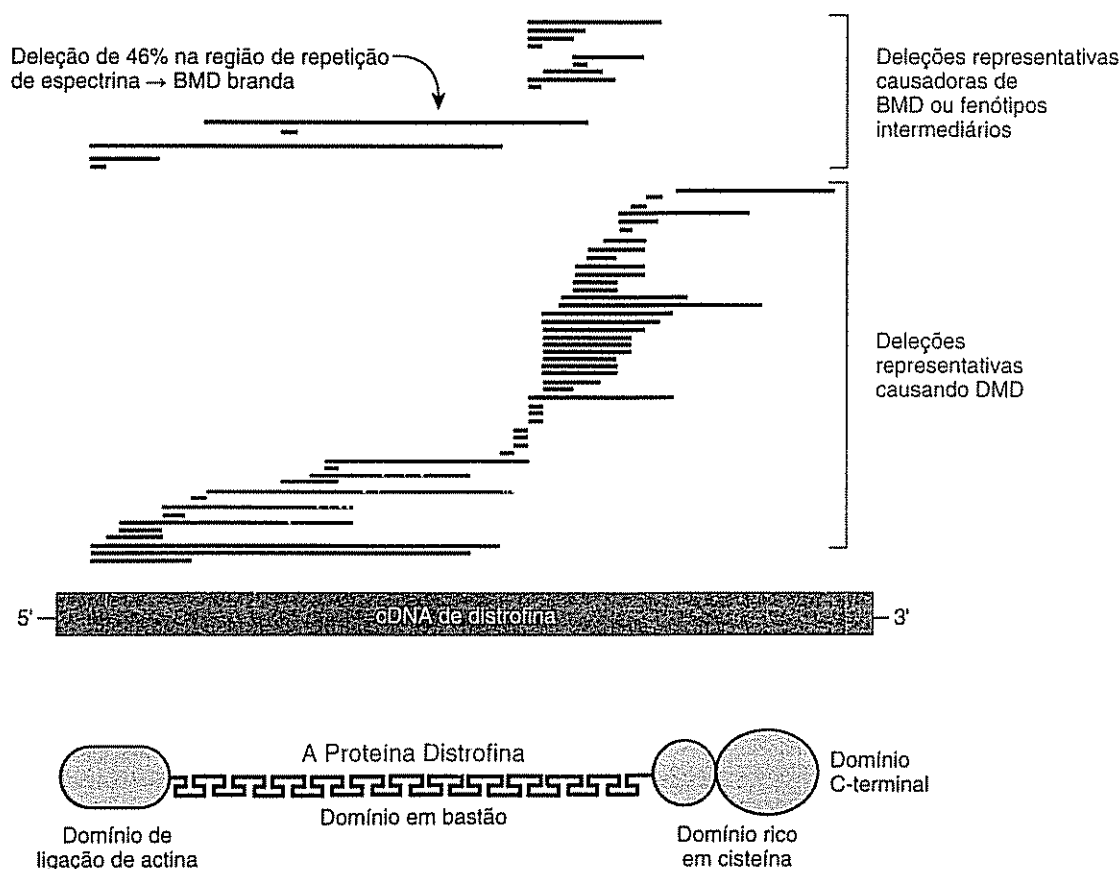



Fig. 12.16 Uma representação do tamanho total da proteína distrofina, o cDNA correspondente e a distribuição das deleções representativas em pacientes com distrofia muscular Becker (BMD) e distrofia muscular Duchenne (DMD). O domínio de ligação da actina liga a proteína ao citoesqueleto filamentar de actina. O domínio em bastão supostamente atua como um espaçador entre os domínios N-terminal e C-terminal. O domínio rico em cisteína medeia as interações proteína-proteína. O domínio C-terminal, que se associa a um grande complexo transmembranar de glicoproteína (ver Fig. 12.17), também é encontrado em três proteínas relacionadas à distrofina (DRPs): utrofina (DRP-1), DRP-2 e distrobrevina. Os domínios proteicos não estão desenhados em escala

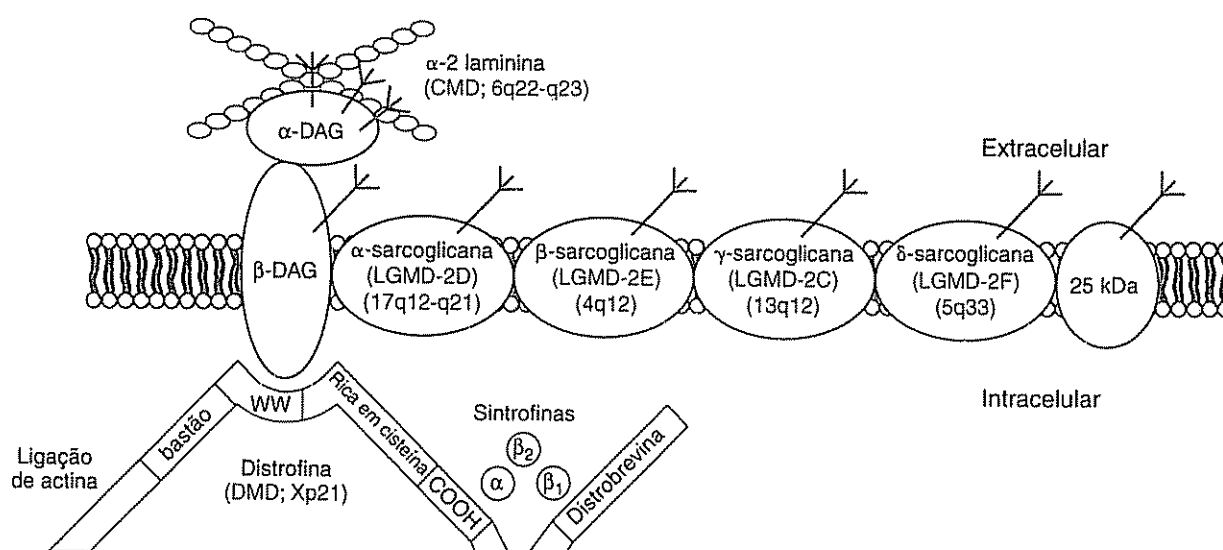



Fig. 12.17 No músculo, a distrofina liga a matriz extracelular (laminina) ao citoesqueleto de actina. A distrofina interage com um complexo multimérico composto de distroglicana (DAG), sarcoglicanas, sintrofinas e distrobrevina. O complexo α,β-distroglicana é um receptor da laminina e agrina na matriz extracelular. A função do complexo sarcoglicana é incerta, mas é integral à função muscular: mutações em sarcoglicanas foram identificadas nas distrofias musculares das cinturas dos membros (LGMD) tipo 2C, 2D, 2E e 2F. Mutações na laminina tipo 2 (merosina) causam uma distrofia muscular congênita (CMD).

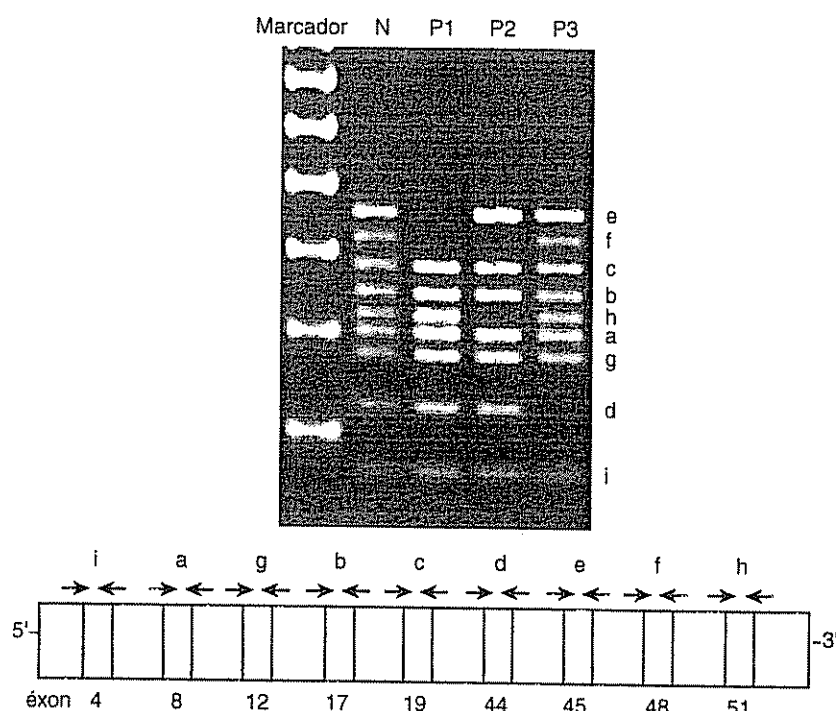



Fig. 12.18 O diagnóstico da distrofia muscular Duchenne envolve a triagem de deleções e duplicações usando um procedimento chamado de reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Usando conjuntos de *primer* (*pares de setas*) que ampliam várias regiões do gene (*a-i*) em uma única reação, o DNA do paciente é analisado quanto às bandas aberrantes ou ausentes por eletroforese em gel. A coluna 2 mostra os nove produtos de PCR de uma pessoa normal (*N*), indicando a presença dos éxons correspondentes. O paciente 1 (*coluna* P1) não tem as bandas e e f, o que identifica uma deleção que inclui os éxons 45-48. O paciente 2 (*P2*) não tem as bandas f e h, o que indica uma deleção que envolve os éxons 48-51. O paciente 3 (*P3*) não tem a banda d e, portanto, tem uma deleção que envolve o éxon 44. (Cortesia de P. N. Ray, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

APLICAÇÕES CLÍNICAS DA GENÉTICA MOLECULAR À DISTROFIA MUSCULAR

Diagnóstico Pré-natal e Detecção de Portadoras. Com as técnicas moleculares, o diagnóstico pré-natal preciso está disponível para pacientes com deleções, duplicações e mutações de ponto conhecidas no gene *DMD*. Em 60% a 70% das famílias nas quais a mutação resulta de uma deleção ou duplicação, a presença ou ausência do defeito podem ser avaliadas pelo exame do DNA fetal por transferência de Southern ou, mais comumente, pela análise multiplex de cadeia da polimerase (ver Fig. 12.18). Na maioria das outras famílias nas quais o defeito molecular ainda não foi definido, os marcadores ligados permitem o diagnóstico pré-natal com uma precisão de cerca de 95%. A identificação da condição de portadora ou não-portadora é possível em cerca de 75% das genitoras de um menino afetado usando-se métodos de DNA e testando-se a elevação de creatina cinase sérica.

Mosaicismo Materno. Se um menino com DMD é o primeiro membro afetado de sua família e sua mãe não leva a mutação em seus linfócitos, a explicação usual é que ele tem uma mutação nova no locus *DMD*. Entretanto, cerca de 5% a 15% de tais casos parecem ser decorrentes de mosaicismo na linhagem germinativa materna e, neste caso, o risco de recorrência é significativo (ver Cap. 5).

Terapia. No momento, apenas o tratamento sintomático está disponível para a DMD. As possibilidades de terapia racional para a DMD aumentaram muito com o isolamento do gene de distrofina e a compreensão de seu papel normal no miócito. Algumas das considerações terapêuticas serão discutidas no Cap. 13.

Mutações em Genes de Colágeno: Osteogênese Imperfeita e Síndrome de Ehlers-Danlos

OSTEOGÊNESE IMPERFEITA: DEFEITOS NOS GENES ESTRUTURAIS DE COLÁGENO

A osteogênese imperfeita (OI) é um grupo de distúrbios herdados do colágeno tipo I que predispõe um paciente à fratura fácil dos ossos, mesmo com pequenos traumas, e à deformidade esquelética (Fig. 12.19). Uma grande gama de variações clínicas já foi reconhecida, desde a forma letal perinatal até apenas um leve aumento na freqüência de fraturas. Os quatro principais fenótipos são mostrados no Quadro 12.9. A heterogeneidade clínica pode ser explicada, pelo menos em parte, pela heterogeneidade alélica: os fenótipos variam de acordo com que cadeia do pró-colágeno tipo I está afetada e de acordo com o tipo e a localização da mutação no locus. A incidência combinada de todas as formas da doença é de cerca de 1 em 10.000.

Estrutura Normal do Colágeno em Relação à Osteogênese Imperfeita. Algumas características do colágeno tipo I normal são essenciais na avaliação da patogenia da doença. O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural do osso e de outros tecidos fibrosos. A molécula de pró-colágeno tipo I é formada por duas cadeias próα1(I) (codificadas no cromossomo 17) e uma cadeia similar, mas distinta, de próα2(I) (codificada no cromossomo 7) (Fig. 12.20).

As proteínas compostas de subunidades, como o colágeno, em geral são sujeitas a mutações que evitam a associação de subunidades alterando as interfaces de subunidades (ver Quadro 11.1).

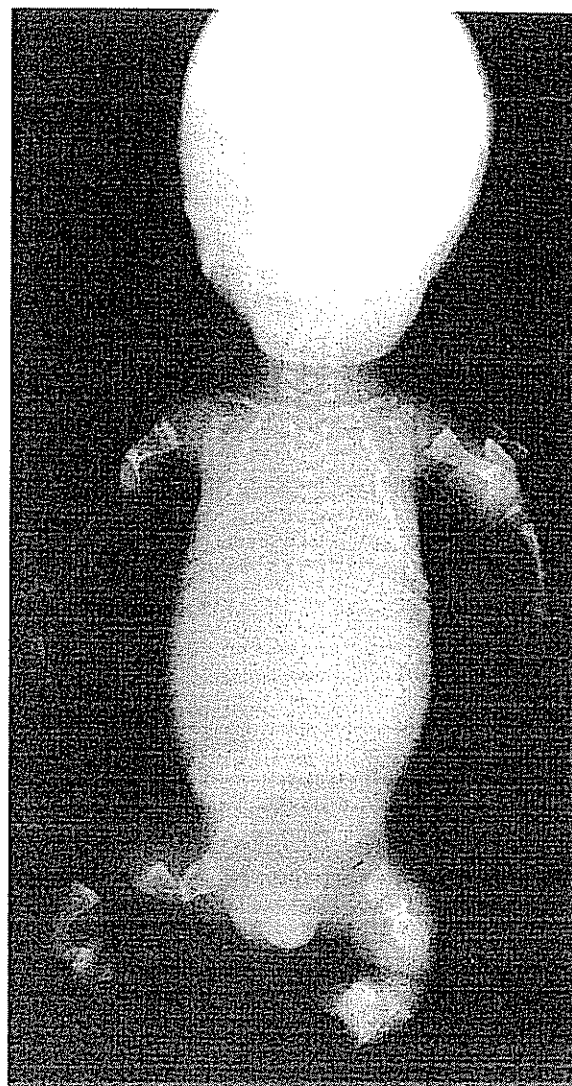



Fig. 12.19 Radiografia de um prematuro (26 semanas de gestação) com a forma letal perinatal (tipo II) de osteogênese imperfeita. O crânio é relativamente grande e não-mineralizado e era mole à palpação. A cavidade torácica é pequena, os ossos longos dos braços e das pernas são curtos e deformados, e os corpos vertebrais são achatados. Todos os ossos são desmineralizados. (Cortesia de T. Costa, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

A seção de hélice tripla (colágeno) é composta de 338 repetições Gli-X-Y dispostas em tandem. A prolina em geral está na posição X e a hidroxiprolina ou hidroxilisina em geral está na posição Y. A glicina, o menor aminoácido, é o único compacto o suficiente para ocupar a posição axial da hélice e, conseqüentemente, as mutações que resultam em substituições por outros aminoácidos perturbam muito a estrutura helicoidal.

Várias características da maturação do pró-colágeno são de significado especial para a fisiopatologia da OI. Primeiro, a montagem das cadeias individuais na hélice tripla começa na ponta C e move-se para a ponta N. Conseqüentemente, as mutações na parte C terminal da molécula são mais perturbadoras porque interferem mais cedo na propagação da hélice tripla (Fig. 12.21). Segundo, a modificação pós-traducional (p. ex., hidroxilação, glicosilação de prolina) do pró-colágeno continua em qualquer parte da cadeia não-montada na hélice tripla. Assim, quando a montagem da hélice tripla é diminuída por uma muta-

QUADRO 12-9

Um Resumo das Características Genéticas, Bioquímicas e Moleculares dos Tipos de Osteogênese Imperfeita

Tipo	Fenótipo	Herança	Defeito Bioquímico	Defeito Genético
Produção defeituosa de colágeno tipo I*				
Tipo I	**Branda:** escleróticas azuis, ossos frágeis, mas sem deformidade óssea; em geral surdez pré-senil	AD	Comum: Todo o colágeno feito é *normal* (pelo alelo normal), mas a quantidade é *reduzida* à metade. Raramente, substituições de gli (ver Fig. 12.21)	Comum: Alelos nulos que prejudicam a produção de cadeias pró $\alpha 1$(I), tais como defeitos que interferem na síntese de mRNA
Defeitos estruturais no colágeno tipo I				
Tipo II	**Letal perinatal:** graves anomalias (fraturas, deformidades), escleróticas escuras, morte dentro de 1 mês	AD (mutação nova)	Comum: Produção de moléculas *anormais* de colágeno em função da substituição de gli em Gli-X-Y do domínio da hélice tripla, com alguma tendência para a parte COOH-terminal da proteína (ver Fig. 12.22)	Comum: Mutações esqueléticas de sentido trocado nos códons de glicina dos genes para as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$
Tipo III	**Deformidade progressiva:** fraturas, em geral ao nascimento, deformidade óssea progressiva, crescimento limitado, escleróticas azuis, dentinogênese imperfeita, perda auditiva	AD[†]	Moléculas anormais de colágeno: substituições gli de muitos tipos na hélice tripla. Situado ao longo da proteína (ver Fig. 12.22)	Mutações de sentido trocado nos códons de glicina dos genes para as cadeias $\alpha 1$ ou $\alpha 2$
Tipo IV	**Escleróticas normais, deformidade:** deformidade óssea de branda a moderada, baixa estatura, fraturas, perda auditiva, dentinogênese imperfeita	AD	Moléculas anormais de colágeno: substituições gli de muitos tipos na hélice tripla. Situado ao longo da proteína (ver Fig. 12.22)	Mutações de sentido trocado nos códons de glicina dos genes para as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$

*Alguns pacientes com a doença tipo 1 têm substituições da glicina em uma das cadeias de colágeno tipo 1 (ver Fig. 12.22).
†Casos raros são autossômicos recessivos
Modificado de Byers P. H. (1989) Disorders of collagen biosynthesis and structure. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic Bases of Inherited Disease, 6.ª ed. McGraw-Hill. New York, pp. 2.805-2.842; e Byers P. H. (1990) Brittle bones-fragile molecules: Disorders of collagen structure and expression. Trends Genet 6:293-300.

ção, os trechos não-montados das cadeias que são aminoterminais ao defeito são muito modificados, o que diminui sua secreção no espaço extracelular. Uma grande modificação também pode interferir na formação das fibrilas de colágeno. Como resultado de todas estas anomalias, não só o número de fibrilas é reduzido, como muitas das que são secretadas são defeituosas. No osso, as cadeias anormais e seu número reduzido levam à mineralização diminuída (ver Fig. 12.19).

Anomalias Moleculares do Colágeno na Osteogênese Imperfeita

Mais de 200 mutações diferentes que afetam a síntese ou a estrutura do colágeno tipo I já foram encontradas em pacientes com OI. A heterogeneidade clínica desta doença reflete uma heterogeneidade ainda maior em nível molecular (ver Quadro 12.9). As mutações enquadram-se em duas classes gerais. Se a mutação diminui a *produção* do colágeno tipo I, o fenótipo relativamente brando da OI tipo I é a conseqüência. Se a mutação altera a *estrutura* da molécula, os fenótipos resultantes são os tipos II, III e IV de OI. Assim, de algum modo, hoje é possível prever o fenótipo que irá resultar de um tipo específico de defeito molecular (Fig. 12.22).

Tipo I: Produção Diminuída de Colágeno Tipo I. A grande maioria de pacientes com OI tipo I tem mutações que prejudicam gravemente a produção do colágeno tipo I, representado como alelo pró$\alpha 1^{\circ}$ na Fig. 12.21. Tipicamente, é a cadeia pró$\alpha 1$ (I) que está afetada. Códons finalizadores prematuros, pequenos trechos de inserção ou deleção (em geral de 1 ou 2 pares de bases) ou mutações de sítio de corte constituem a maioria das mutações. As mutações sem sentido originam esta forma branda de OI quando a mudança de aminoácido está situada no terminal N, porque as substituições neste local tendem a perturbar menos a montagem do colágeno (ver Fig. 12.22).

Tipos II, III e IV: Colágenos Estruturalmente Defeituosos. Os fenótipos tipos II, III e IV de OI resultam de mutações que produzem cadeias anormais pró$\alpha 1$ (ver Figs. 12.21 e 12.22) (as mutações na cadeia pró$\alpha 2$ têm um efeito comparável). A grande maioria destes pacientes tem substituições na hélice tripla que substituem uma glicina por um aminoácido mais volumoso. O gene afetado, a localização da substituição e o aminoácido substituto são todos determinantes fenotípicos importantes, mas algumas generalizações sobre o fenótipo provavelmente associado a uma substituição específica entretanto são possíveis. Assim, as substituições na cadeia pró$\alpha 1$ são mais prevalentes e em geral mais letais na população de pacientes com OI tipos II, III ou IV. Em qualquer cadeia, a substituição de glicina (um aminoácido neutro) por aspartato (que é ácido) geralmente é muito perturbadora e associada com mais freqüência a um fenótipo grave (tipo II) (ver Fig. 12.22). Às vezes, uma substituição específica está associada a mais de um fenótipo, um resultado que provavelmente reflete a influência de poderosos genes modificadores deste distúrbio monogênico

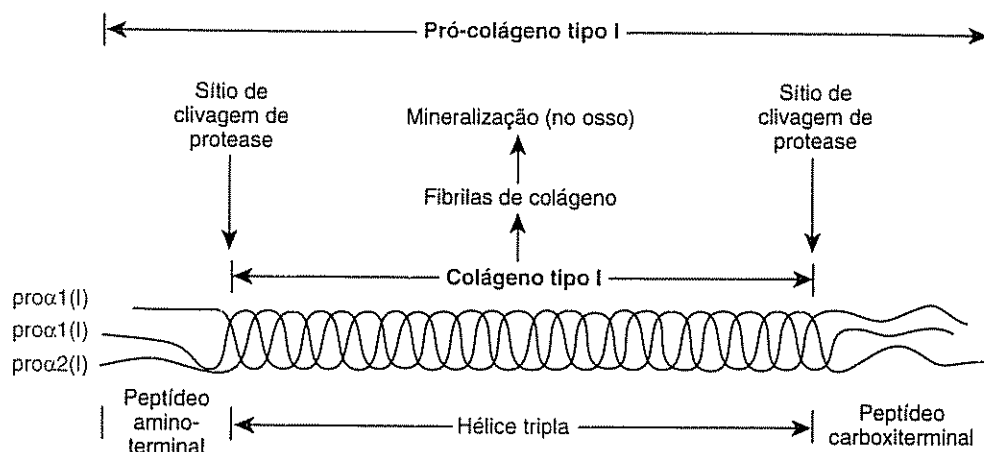



Fig. 12.20 A estrutura do pró-colágeno tipo I Cada cadeia de colágeno é feita de uma tripla hélice que é secretada no espaço extracelular Os domínios amino- e carboxi-terminal são clivados extracelularmente para formar colágeno; as fibrilas de colágeno maduro são então montadas e no osso, mineralizadas Notar que o pró-colágeno tipo I é composto de duas cadeias próα1(I) e uma cadeia próα2(I) (Redesenhado de Byers P H. [1989] Disorders of collagen biosynthesis and structure. *In* Scriver C R. Beaudet A L. Sly W S. Valle D [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease. 6.ª ed McGraw-Hill, New York pp 2 805-2 842)

A Genética da Osteogênese Imperfeita

A maioria das mutações que causam a doença é de ação dominante, mas algumas são recessivas. Pelo menos alguns dos mecanismos pelos quais diferentes padrões de herança surgem de mutações diferentes em uma única molécula foram revelados pela caracterização dos defeitos bioquímicos. De modo mais geral, esta doença ilustra as complexidades genéticas que resultam de mutações que alteram proteínas estruturais, em particular as compostas por várias subunidades diferentes.

O fenótipo relativamente brando e a herança dominante do tipo I de OI são compatíveis com o fato de que embora apenas metade do número normal de moléculas seja produzido, elas são de qualidade normal (ver Fig. 12.21). As conseqüências mais graves da produção de cadeias próα1 estruturalmente defeituosas (em comparação à não-produção de cadeias) reflete em parte a estequiometria do colágeno tipo I, que é de duas cadeias próα1 para uma cadeia próα2 (ver Fig. 12.21). Em concordância, se uma cadeia próα1 é anormal, três das quatro moléculas tipo I têm pelo menos uma cadeia anormal. Em contraste, se uma cadeia próα2 é defeituosa, apenas uma das duas moléculas é afetada. Mutações tais como o alelo de sentido trocado de próα1 (pró$\alpha 1^{M}$) mostradas na Fig. 12.21 são **alelos negativos dominantes** porque impedem a contribuição dos alelos normais próα1 e próα2. Em outras palavras, o efeito do alelo mutante é ampliado devido à natureza polimérica da molécula de colágeno. Em conseqüência, nas doenças de herança dominante tais como a OI, é melhor ter uma mutação que não gere *nenhum* produto gênico do que uma que gere um produto gênico *anormal*.

Embora as mutações que produzam cadeias próα2 estruturalmente anormais reduzam o número de moléculas de colágeno tipo I normal pela metade (*versus* três quartos nas cadeias estruturalmente anormais de próα1; ver Fig. 12.21), esta redução, entretanto, é suficiente, no caso de algumas mutações, para causar o grave fenótipo letal pré-natal (ver Quadro 12.9).

A maioria das crianças com a forma letal perinatal tipo II de OI tem uma *nova* mutação dominante e, conseqüentemente, a probabilidade de recorrência na família é muito baixa. Em famílias ocasionais, entretanto, mais de um irmão é afetado com a doença tipo II. Tais recorrências parecem ser invariavelmente decorrentes de mosaicismo germinativo parental (ver heredograma na Fig. 5.28). Não foi apresentada uma forte documentação de formas autossômicas recessivas do tipo II de OI, mas alguns exemplos de OI tipo III recessiva foram reconhecidos.

Tratamento Clínico e Diagnóstico Pré-natal. O conhecimento de OI que está surgindo tem aplicações úteis para o prognóstico. Se o defeito molecular de um paciente pode ser determinado, em geral é possível prever, até certo ponto, a história natural da doença. Além disso, demonstrar que um defeito é herdado de um genitor afetado (autossômico dominante), de um genitor não-afetado (com mosaicismo germinativo), de dois genitores não-afetados mas heterozigotos (autossômico recessivo) ou como uma mutação nova permite que os riscos de recorrência sejam calculados. O diagnóstico pré-natal na OI tipo II, a forma letal perinatal, pode ser feito pelo exame do tamanho do crânio e dos membros por ultra-sonografia no segundo trimestre. Entretanto, para a maioria das gestações em risco, o diagnóstico pré-natal requer a análise do colágeno sintetizado por células cultivadas de amostras de vilosidades coriônicas ou análise direta de uma mutação (ou análise de sítios de restrição polimórficos) previamente identificados na família.

Embora o tratamento da OI seja restrito a medidas cirúrgicas e médicas em geral, esta situação é desafiadora, em função da descoberta dos efeitos benéficos dos bisfosfonatos, uma classe de drogas que atua diminuindo a reabsorção óssea. Estes compostos demonstraram aumentar tanto a densidade óssea quanto o conteúdo mineral dos pacientes com OI grave. O aspecto mais crítico, ou seja, se os bisfosfonatos reduzem a freqüência e a gravidade das fraturas na OI, está em estudo.

Síndrome de Ehlers-Danlos Tipo VI: Modificação Pós-Traducional Defeituosa do Colágeno

Em alguns casos, a modificação pós-traducional pode ser uma característica permanente essencial de uma estrutura ou função da proteína (ver Quadro 11.1). Os defeitos nas modificações pós-traducionais podem causar doença. Um distúrbio que

Tipos disponíveis de cadeias isoladas

Cadeias reunidas

Conseqüências de mutação

Efeito estequiométrico de próα1°:

Proα1
Alelo nulo próα1°
Proα2
Proα2

α1
α1
α2 I

½ do número de moléculas normais

Colágeno tipo I normal

½ da quantidade normal

↓

número reduzido de fibrilas tipo I

↓

OI Tipo I

Efeito estequiométrico de próα1ᴹ

Proα1ᴹ
Proα1
Proα2
Proα2

α1
α1
α2 I

Colágeno tipo I normal

α1ᴹ
α1
α2 Iᴹ

α1
α1ᴹ
α2 Iᴹ

α1ᴹ
α1ᴹ
α2 Iᴹᴹ

Proporção de moléculas normais/mutantes = 1:3

Colágeno tipo I anormal

↓ Taxa de formação de hélice tripla

↓

↑ Modificação pós-traducional de terminal NH_2 para mutação

↓

↓ Secreção e ↑ de degradação

↓

Fibrilas de colágeno defectivas

↓

Pouca mineralização (no osso)

↓

Tipo I, II, III ou IV de OI
(fenótipo depende da substituição)

Efeito estequiométrico de próα2ᴹ:

Proα1
Proα1
Proα2
Proα2ᴹ

α1
α1
α2 I

Colágeno tipo I normal

α1
α1
α2ᴹ Iᴹ

Colágeno tipo I anormal

Anomalias bioquímicas similares às acima, mas que podem ser menos graves

↓

Tipo II, III ou IV de OI
(fenótipo depende da substituição)

Proporção de moléculas normais/mutantes = 1:1

Fig. 12.21 A patogenia das principais classes de mutantes de pró-colágeno tipo I. Coluna 1: os tipos de cadeias de pró-colágeno disponíveis para montagem da tripla hélice. Coluna 2: o efeito da estequiometria do pró-colágeno tipo I na proporção de moléculas normais para anormais formadas em mutantes com cadeia próα1 *versus* mutações próα2. As pequenas barras verticais em cada cadeia de pró-colágeno indicam modificações pós-traducionais (ver texto). Coluna 3: o efeito de mutações no processamento bioquímico do colágeno. Próα1ᴹ = uma cadeia próα1 com uma mutação de sentido trocado; próα2ᴹ = uma cadeia próα2 com uma mutação de sentido trocado; próα1⁰ = um alelo nulo de cadeia próα1

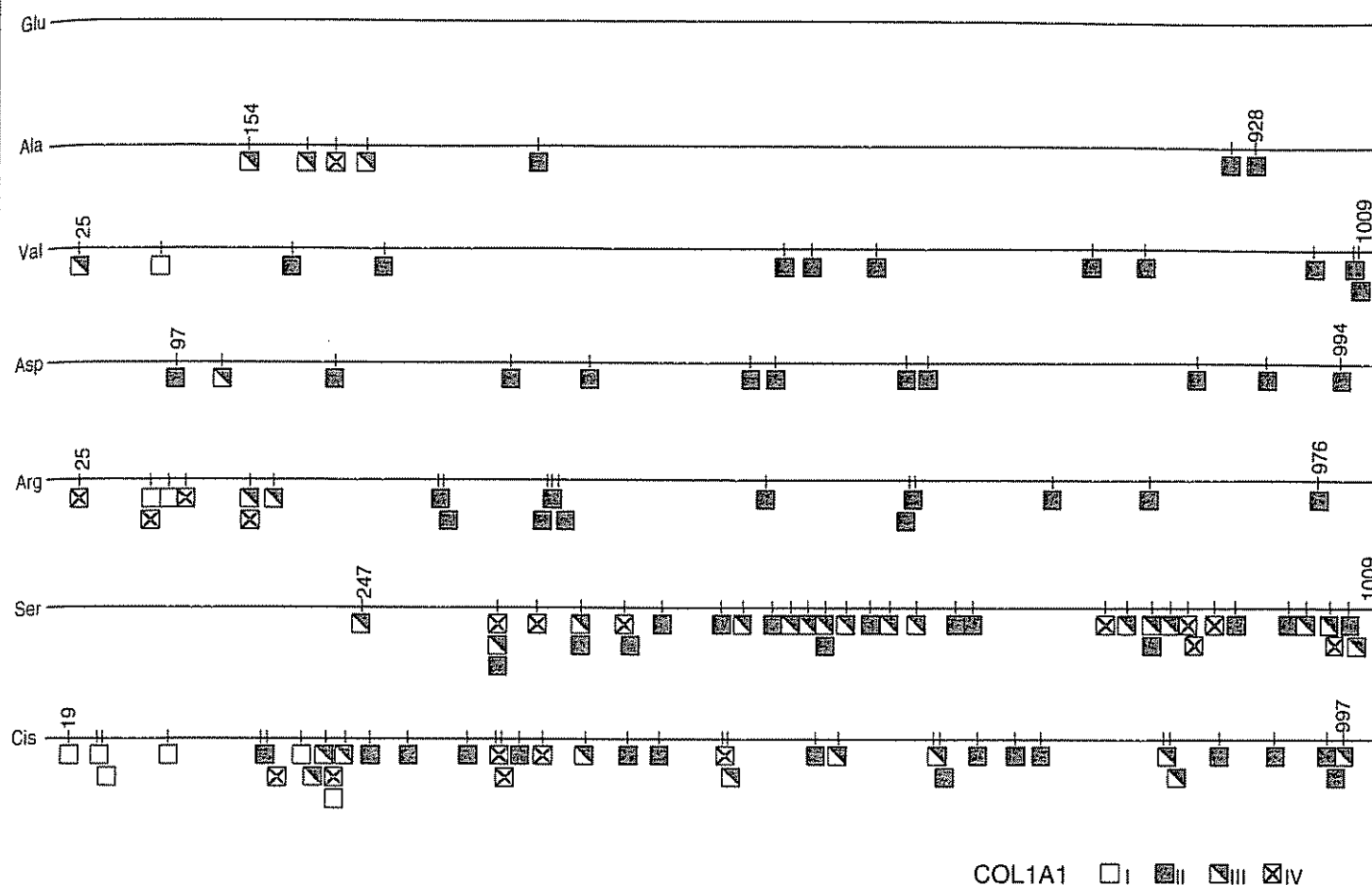



Fig. 12.22 O efeito fenotípico de substituições de cadeia próα1 do colágeno tipo I I, II, III e IV = Tipos I-IV de osteogênese imperfeita Os números acima da linha representam as moléculas de colágeno em que as glicinas foram substituídas pelo aminoácido indicado à esquerda de cada linha Notar que, em geral, o efeito fenotípico das substituições perto do terminal carboxila são mais graves, mas o efeito também depende da natureza do aminoácido que substitui a glicina (Redesenhado de Byers P H (1990) Brittle bones — fragile molecules: Disorders of collagen structure and expression Trends Genet 6:293-300)

resulta da deficiência de uma modificação pós-traducional permanente do colágeno é a síndrome de Ehler-Danlos tipo VI. Esta síndrome é um grupo heterogêneo de doenças do tecido conjuntivo caracterizadas por fragilidade da pele, hipermobilidade das articulações e hiperextensibilidade da pele (Fig. 12.23). Em dois tipos, o defeito básico foi encontrado no gene estrutural das cadeias de colágeno I ou III, sendo estes os colágenos predominantes dos tecidos afetados. No distúrbio tipo VI, entretanto, a doença resulta de uma modificação pós-traducional defeituosa dos colágenos I e III, causada por uma deficiência da enzima lisil hidroxilase. A hidroxilação de algumas lisinas do colágeno é essencial para a formação de ligações cruzadas intermoleculares normais entre as moléculas de colágeno, um processo que estabiliza a rede fibrilar de colágeno.

DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS

Doença de Alzheimer

Até pouco tempo atrás, os mecanismos bioquímicos subjacentes a quase todas as doenças neurodegenerativas eram totalmente obscuros. Uma das mais comuns destas condições, a AD, afeta cerca de 1,4% das pessoas nos países desenvolvidos e é responsável por 100.000 mortes por ano apenas nos EUA. A AD em geral se manifesta entre os 70 e os 90 anos, mas as formas monogênicas normalmente se apresentam mais cedo, às vezes tão cedo quanto na terceira década de vida. O quadro clínico é variável, mas inclui a deterioração progressiva da memória e das funções cognitivas superiores, tais como o raciocínio, além de mudanças comportamentais. Estas anomalias refletem a degeneração dos neurônios em regiões específicas do córtex cerebral, particularmente o córtex temporoparietal, e o hipocampo

A Genética da Doença de Alzheimer. Aos 85 anos de idade, os parentes em primeiro grau dos pacientes com AD têm um risco final de 38% de adquirir a doença. Conseqüentemente, parece que a maioria dos casos com agregação familiar tem uma contribuição genética complexa. Esta contribuição vem de um ou mais genes incompletamente penetrantes que atuam de modo independente, da interação de múltiplos genes ou de alguma combinação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 10% dos pacientes têm uma forma monogênica da doença, a AD familiar (FAD), com herança autossômica dominante relacionada à idade altamente penetrante. Na década de 1990, a identificação de quatro genes AD (Quadro 12.10) esclareceu não só a FAD, mas também, como comumente é o caso em

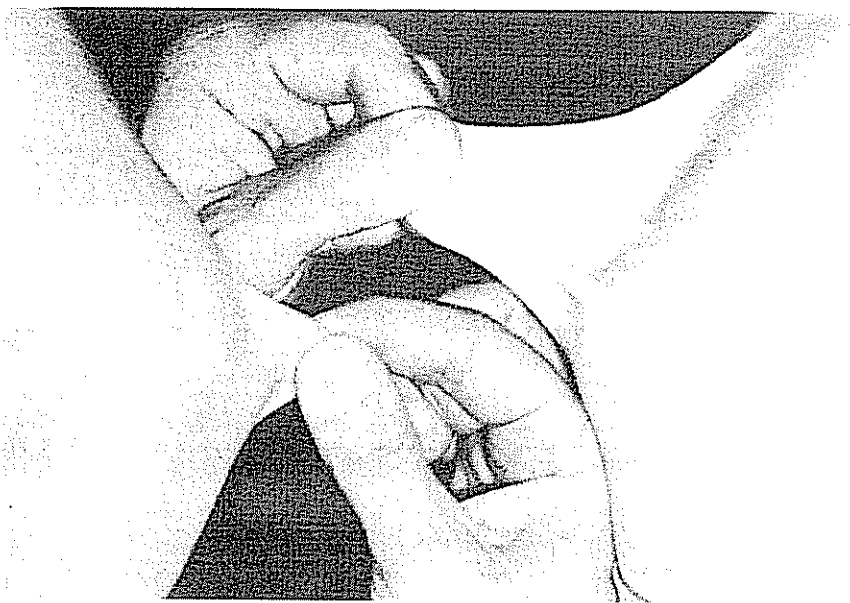



Fig. 12.23 A pele hiperextensível de um paciente com síndrome de Ehlers-Danlos (Reproduzida de Byers P H., Holbrook K A [1979]. Heritable disorders of connecive tissue In Cohen A S [ed] The Science and Practice of Clinical Medicine. vol 4: Rheumatology and Immunology Grune and Stratton, New York. p 344)

genética médica, a base bioquímica da forma mais comum, a AD esporádica.

O Peptídeo Beta-amilóide e os Depósitos da Proteína Tau São Centrais à Patogenia da Doença de Alzheimer. As anomalias patológicas mais importantes da AD são o depósito no cérebro de duas proteínas fibrilares, o peptídeo β-amilóide (Aβ) e a proteína Tau. O peptídeo Aβ, que é gerado a partir da proteína codificada em um dos genes FAD de suscetibilidade (Quadro 12.10), é encontrado nas placas amilóides ou senis no espaço extracelular cerebral dos cérebros com AD. As placas amilóides contêm outras proteínas além do peptídeo Aβ, notadamente a apolipoproteína E (ApoE), também codificada por um gene AD de suscetibilidade (*APOE*) (Quadro 12.10). As formas hiperfosforiladas da proteína Tau compreendem os emaranhados neurofibrilares que, em contraste com as placas amilóides, são encontrados *dentro* dos neurônios na AD. Tau é uma proteína associada a microtúbulos expressa abundantemente nos neurônios do cérebro. A proteína promove a montagem e a estabilidade dos microtúbulos, funções que estão diminuídas pela fosforilação. Embora a formação dos emaranhados neurofibrilares de Tau pareça ser uma das causas da degeneração neuronal na AD, as mutações no gene *TAU* estão associadas não à AD, mas a um distúrbio autossômico dominante correlato, a demência frontotemporal.

A Proteína Precursora Amilóide Origina o Peptídeo Beta-amilóide. As principais características da proteína precursora amilóide (βAPP) e seu gene correspondente estão resumidas no Quadro 12.10. A proteína, que tem um único domínio transmembranar, está sujeita a dois destinos catabólicos proteolíticos distintos. Em sua principal via catabólica, um domínio de 40-42 aminoácidos de βAPP, chamado de peptídeo Aβ, é clivado por uma protease de superfície α-secretase (Fig. 12.24). Esta clivagem evita a formação de Aβ, porque digere a proteína dentro do domínio que origina o peptídeo (Fig. 12.24). Uma segunda via, a secundária, está envolvida na clivagem de βAPP na N-terminal do domínio do peptídeo Aβ (pela β-secretase) no terminal C do domínio do peptídeo Aβ que fica dentro da região transmembranar de βAPP (pela γ-secretase). Estes dois eventos de clivagem geram uma série de peptídeos Aβ, com 40 a 42 aminoácidos de tamanho (Aβ_{40-42}), via ação conjunta de β-secretase e γ-secretase. O peptídeo Aβ_{42} é considerado o mais neurotóxico, porque é o mais fibrilogênico. Várias das mutações no gene *βAPP* aumentam seletivamente a produção de Aβ_{42}, e a superprodução do peptídeo Aβ parece ser o evento patogênico central na doença. Compatível com este modelo é o fato de que os pacientes com síndrome de Down, com três cópias do gene *βAPP* (que está no cromossomo 21), desenvolvem a neuropatologia da AD aos 40 anos de idade. Além disso, as mutações nos genes de AD presenilina 1 (*PS1*) e presenilina 2 (*PS2*) (ver Quadro 12.10) também levam a um aumento de produção de Aβ_{42}.

Os Genes de Presenilina 1 e 2. Os genes *PS1* e *PS2* (ver Quadro 12.10) foram identificados por estratégias de clonagem posicional em famílias com FAD. A função normal exata destas proteínas é desconhecida, mas a presenilina 1 é necessária para a clivagem de γ-secretase dos derivados βAPP. De fato, algumas evidências sugerem que a presenilina 1 pode ser a própria γ-secretase. As mutações em *PS1* associadas à AD provavelmente são de ganho de função, sendo o aumento de produção do peptídeo Aβ_{42} o efeito principal. A proteína presenilina 2 é 60% idêntica em seqüência à presenilina 1, o que sugere que os dois polipeptídeos têm funções correlatas. Uma diferença importante entre as mutações *PS1* e *PS2* é que a idade de início com a última é muito mais variável (*PS1*, de 35 a 60 anos; *PS2*, de 40 a 85 anos), e em uma família um octagenário assintomático portador da mutação *PS2* transmitiu a doença para sua prole. A base desta variação é desconhecida, mas foi demonstrado que o único gene modificador conhecido do fenótipo AD, o gene da apolipoproteína E (*APOE*) (ver Quadro 12.10 e discussão posterior), não é o responsável.

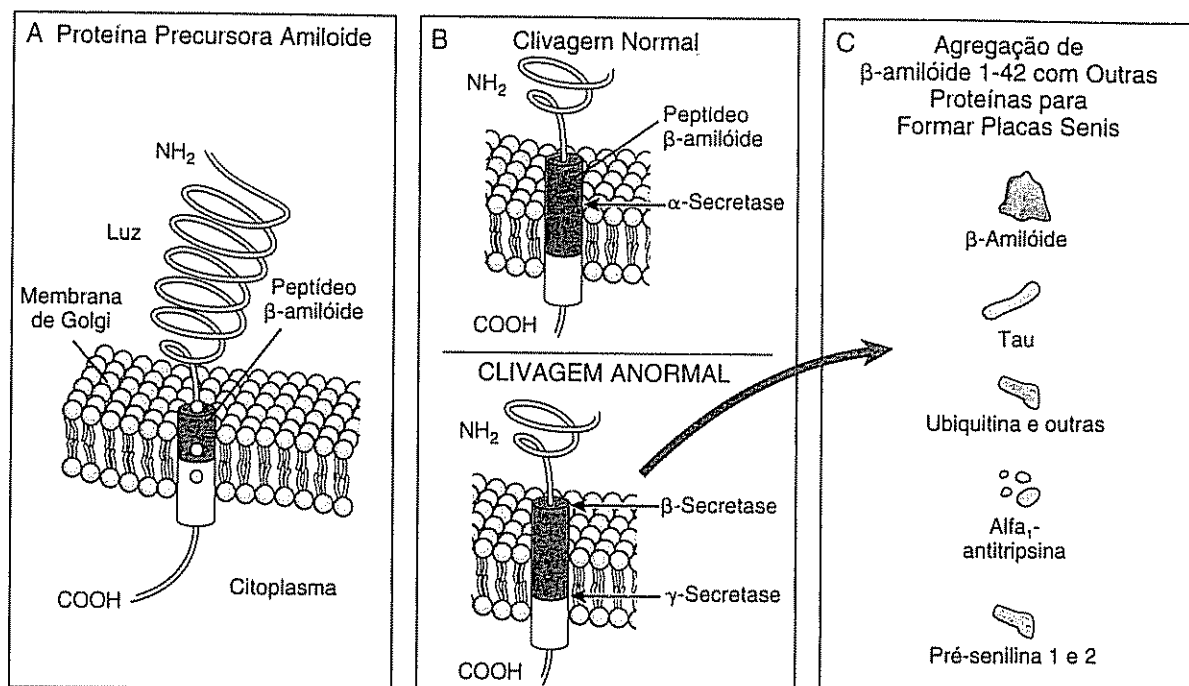



Fig. 12.24 A topologia da proteína precursora amilóide (βAPP), sua clivagem não-amiloidogênica pela α-secretase e sua clivagem alternativa por β-secretase e γ-secretase hipotéticas para gerar o peptídeo amiloidogênico β-amilóide (Aβ) (Reproduzido com permissão de Martin J B (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. New Engl J Med 340:1970-1980 Copyright © 1999 Massachusetts Medical Society Todos os direitos reservados.)

O Gene APOE É um Locus de Suscetibilidade à Doença de Alzheimer. O papel do gene *APOE* como um locus importante de suscetibilidade na AD foi sugerido por quatro linhas independentes de evidência: análises de ligação em famílias com manifestação tardia e agregação de AD, aumento de associação do alelo $\varepsilon4$ em pacientes AD comparados com os controles, a descoberta de que a proteína ApoE é um componente das placas amilóides de AD e o achado de que ApoE liga-se ao peptídeo Aβ. A proeina ApoE tem três formas alélicas comuns (Quadro 12.11). O alelo $\varepsilon4$ tem freqüência aumentada nos pacientes com AD e está associado a um início precoce de AD. Além disso, a correlação entre o alelo $\varepsilon4$ e a doença é dose-dependente: duas cópias de $\varepsilon4$ estão associadas a um início mais precoce (média de início antes dos 70 anos) que uma cópia (média de início após os 70 anos) (ver Fig. 15.6). Em contraste, o alelo $\varepsilon2$ tem um efeito protetor e, correspondentemente, é mais comum na população em geral (Quadro 12.11). Os mecanismos subjacentes a estes efeitos não são conhecidos, mas os polimorfismos de ApoE podem influenciar o acúmulo dos peptídeos Aβ nos cérebros dos pacientes com AD. Por exemplo, os camundongos sem ApoE têm uma acentuada redução no depósito de peptídeo Aβ gerado por um alelo mutante βAPP associado à FAD.

Distúrbios de Repetição de Trincas: Mutações Dinâmicas Instáveis

Em todos os tipos de herança já apresentados (ver Cap. 5), a mutação responsável é *estável* de geração para geração. Isto é, todos os membros afetados de uma família compartilham uma mutação idêntica herdada. Em contraste, toda uma classe nova de doenças genéticas foi reconhecida, as doenças decorrentes de **mutações dinâmicas** *instáveis* em um gene, das quais as mais comuns são os **distúrbios de repetição de trincas**. Por definição, estas condições são caracterizadas pela expansão, dentro do gene afetado, de um segmento de DNA que contém uma repetição de três nucleotídeos (repetições de trinca) tais como CAGCAGCAG...CAG ou CCGCCGCCG ... CCG. À medida que o gene é passado de geração em geração, o número de repetições de trincas aumenta (sofre **expansão**), levando a anomalias na expressão do gene e em seu funcionamento.

O reconhecimento das doenças de repetições de trincas começou em 1991, com relatos de expansão de repetição de trincas instáveis tanto no locus da síndrome do X frágil quanto no gene de receptor de andrógenos em pacientes com o raro distúrbio genético conhecido como doença de Kennedy (ou atrofia muscular espinobulbar). Logo depois, uma alteração genética similar foi encontrada subjacente à distrofia miotônica e doença de Huntington, demonstrando, assim, a existência de um mecanismo mutacional inteiramente novo que, notadamente, nunca tinha sido observado em qualquer outro genoma.

Mais de uma dúzia de doenças resultantes de expansões de repetições de trincas são conhecidas. Os exemplos representativos destes distúrbios estão resumidos no Quadro 12.12. Todas estas condições são primariamente neurológicas. A descoberta deste grupo incomum de condições contradiz as noções ortodoxas de estabilidade da linhagem germinativa e dá uma base biológica para tais fenômenos excêntricos como a antecipação e a tendenciosidade de transmissão parental.

Características Comuns e Contrastantes dos Distúrbios de Repetição de Trincas. Embora todos os distúrbios de repetições de trincas sejam causados por mutações dinâmicas de repetições de trincas, existem também diferenças significativas

QUADRO 12–10

Os Genes e as Proteínas Associados à Suscetibilidade Herdada para a Doença de Alzheimer

Gene	Características da Proteína	Função Normal	Papel na Doença de Alzheimer Familiar (FAD)	Localização Cromossômica	Porcentagem de FAD	Padrão de Herança
Proteína precursora amilóide (*βAPP*)	Uma única proteína transmembranar, encontrada nos endossomos, lisossomos, RE e Golgi. Normalmente, *βAPP* é clivada endoproteoliticamente dentro do domínio transmembranar, e assim é formado pouco peptídio β-amilóide ($A\beta$).	Desconhecida	O peptídeo β-amilóide ($A\beta$) é o principal componente das placas senis. O aumento de produção de $A\beta$, especialmente da forma $A\beta_{42}$, é um importante evento patogênico. < 10 mutações FAD conhecidas. Provavelmente elas aumentam a produção de $A\beta_{42}$.	21	< 1%	AD
Pré-senilina 1 (*PS1*)	Um domínio de 5-10 proteínas de membrana presentes em muitos tipos de células tanto dentro quanto fora do cérebro. Situada nas membranas intracelulares no RE, Golgi e outras vesículas citoplasmáticas não-caracterizadas.	Desconhecida, mas necessária para a clivagem de γ-secretase da *βAPP*. Algumas evidências sugerem que seja a γ-secretase.	Pode participar do tráfego de *βAPP* e suas proteínas derivadas. Mais de 40 mutações em FAD. A maioria provavelmente de ganho de função e aumento de produção de $A\beta_{42}$.	14q24.3	50%	AD
Pré-senilina 2 (*PS2*)	Estrutura similar à *PS1*. A expressão máxima é fora do cérebro. Similar à *PS1* em localização. Pode ter funções similares à *PS1*.	Desconhecida	Apenas duas mutações de sentido trocado identificadas.	1q42.1	< 1%	AD
Apolipoproteína E (*APOE*)	Um componente proteico de várias lipoproteínas plasmáticas (p. ex., VLDL). O mRNA de *APOE* não é transcrito nos neurônios; a proteína é importada do espaço extracelular para o citoplasma.	Desconhecida a função normal nos neurônios. Fora do cérebro, *APOE* participa do transporte de lipídeos entre os tecidos e as células. A perda de função causa uma forma (tipo III) de hiperlipoproteinemia.	Um gene de suscetibilidade à doença de Alzheimer (ver Quadro 12.11). *APOE* é um componente das placas senis.	19q13	<< 1% de taxa	Ver Quadro 12.11

FAD = doença de Alzheimer familiar.

Dados derivados de St George-Hyslop P. H., Farrer L. A., Goedert M. (2001) Alzheimer's disease and the fronto-temporal dementias: Diseases with cerebral deposition of fibrillar proteins. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª ed. McGraw-Hill, New York; e Martin J. B. (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. New Engl J Med 340:1970-1980.

QUADRO 12-11

As Substituições de Aminoácidos Subjacentes a Três Alelos Comuns de ApoE

Alelo	ε2	ε3	ε4
Aminoácido 112	Cis	Cis	Arg
Aminoácido 158	Cis	Arg	Arg
Freqüência na população caucasiana	10%	75%	15%
Freqüência nos pacientes com doença de Alzheimer	2%	58%	40%
Efeito na doença de Alzheimer	Protetora	Nenhum conhecido	de 30% a 50% do risco genético de AD

Dados derivados de St George-Hyslop P H., Farrer L. A., Goedert M. (2001) Alzheimer's disease and the fronto-temporal dementias: Disease with cerebral deposition of fibrillar proteins *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp 5 875-5 902

entre os vários distúrbios Um padrão de herança dominante ocorre em alguns, e a herança recessiva em outros. Em geral, os genes tipo selvagem associados a estas doenças são polimórficos, com números variáveis mas relativamente baixos de unidades repetidas em tandem (adjacentes). O grau de expansão da unidade repetida que causa a doença às vezes é sutil (como no raro distúrbio distrofia muscular oculofaríngea) e às vezes é explosivo (como na distrofia miotônica congênita ou na grave síndrome do X frágil) (Quadro 12.12).

Outras diferenças incluem a seqüência de bases da repetição; o tamanho da repetição em pessoas normais, pré-sintomáticas e naquelas totalmente afetadas; a localização da repetição dentro dos genes; a patogenia da doença; o grau no qual as repetições são instáveis durante a meiose ou a mitose; e os efeitos do genitor de origem na expansão da repetição. As quatro diferentes doenças que revimos aqui ilustram as similaridades e as diferenças entre as doenças de repetição de trincas descritas até hoje (Quadro 12.12). Estes quatro distúrbios são (1) a doença de Huntington (HD) (e outras doenças neurodegenerativas progressivas, tais como a atrofia muscular espinobulbar e a ataxia espinocerebelar autossômica dominante) devida à expansão de vias de múltiplas glutaminas (poliglutamina); (2) a síndrome do X frágil; (3) a distrofia miotônica e (4) a ataxia de Friedreich.

O Pareamento Desalinhado É Subjacente à Expansão de Repetição de Trincas. O mecanismo bioquímico pelo qual as expansões de repetições de trincas são geradas provavelmente é o mesmo para todas as doenças de repetição de trincas. O mecanismo considerado mais provável é o pareamento desalinhado, que foi apresentado no Cap. 11 (ver Fig. 11.8) como explicação para muitas pequenas deleções em regiões de curtas repetições de seqüências. As inserções também podem surgir por pareamento desalinhado na forquilha de replicação, mediado por repetições diretas tais como $(CAG)_n$. Ocorre uma inserção quando o filamento recém-sintetizado se dissocia do filamento molde durante a síntese de replicação. O novo filamento pode retroceder para se alinhar com uma cópia repetida que não sua cópia cognata. Uma vez retomada a síntese de DNA, a molécula desalinhada conterá uma ou mais cópias extras da repetição (dependendo do número de cópias da repetição que foram puladas no evento de desalinhamento).

DISTÚRBIOS DE POLIGLUTAMINA

Doença de Huntington. A **HD** é um distúrbio bem-conhecido que ilustra muitas das características genéticas e bioquímicas comuns dos distúrbios de poliglutamina. A HD foi inicialmente descrita pelo médico George Huntington, em 1872, em uma família americana de descendência inglesa. A neuropatologia é dominada por degeneração do estriado e do córtex. Os pacientes apresentam-se clinicamente pela primeira vez na meia-idade e manifestam um fenótipo característico de anomalias motoras (coréia, distonia), mudanças de personalidade, perda gradual da cognição e, finalmente, morte.

A HD é um distúrbio autossômico dominante. A perda de função do alelo mutante, causando haploinsuficiência, parece não ser subjacente à herança dominante na HD, pois os pacientes heterozigotos e homozigotos que têm a mutação têm fenótipos idênticos e porque uma deleção de um gene *HD* não tem fenótipo em humanos. Como será discutido mais adiante, os alelos mutantes parecem conferir propriedades novas à proteína.

Embora inicialmente a HD pareça se comportar como uma condição direta autossômica dominante, havia peculiaridades óbvias em sua ocorrência que não podiam ser explicadas. A idade de manifestação da HD é variável. Apenas cerca de metade dos indivíduos que portam um alelo *HD* mutante apresenta sintomas com a idade de 40 anos. A doença de manifestação bem precoce, começando durante a infância ou adolescência, ocorre em algumas famílias, mas apenas quando o gene mutante é herdado paternamente. A doença parece se desenvolver em idade cada vez mais jovem quando transmitida ao longo do heredograma, um fenômeno chamado de **antecipação**, mas apenas quando transmitida por um pai afetado e não por uma mãe afetada.

As peculiaridades de herança da HD são hoje prontamente explicadas pela descoberta da mutação: uma expansão de um trecho de repetições de trinca CAG, o códon que especifica o aminoácido glutamina, na região codificante de um gene para uma proteína de função desconhecida chamada huntingtina. Os indivíduos normais possuem entre 9 e 35 repetições CAG em seu gene *HD*, com uma média de 18 a 19. Os indivíduos afetados por HD têm 40 ou mais repetições, com uma média por volta de 46. Um número limítrofe de repetições de 36 a 39, embora em geral associado à HD, pode ser encontrado em alguns indivíduos que não apresentam sinais da doença mesmo em idade um pouco avançada. Quando a expansão é maior que 40, entretanto, sempre ocorre a doença, e quanto maior a expansão, mais cedo é o início da doença (Fig. 12.25).

Então como uma pessoa tem uma expansão da repetição CAG em seu gene de *HD* (Fig. 12.26)? De maneira mais comum, ela a herda como uma característica autossômica direta de um genitor afetado que já tem uma repetição expandida (>36). Ao contrário das mutações estáveis, entretanto, o tamanho da repetição pode se expandir na transmissão, resultando em início mais precoce da doença nas últimas gerações (explicando, assim, a antecipação). Por outro lado, as repetições na faixa de 40 a 50 podem não resultar em doença até um período mais tardio da vida, explicando, assim, a penetrância dependente de idade. No heredograma mostrado na Fig. 12.26, a pessoa

QUADRO 12–12

Quatro Exemplos Representativos de Doenças por Repetições de Trincas

Doença	Padrão de Herança	Trinca Repetida	Gene Afetado	Localização do Gene	Mecanismo da Doença	N.º de Repetições		
						Normais	*Intermediário Instável*	*Afetado*
Doença de Huntington	Autossômica dominante	CAG	huntingtina	região codificante	Efeito tóxico de glutaminas?	< 36	29-35 em geral não-afetados	> 35
X frágil	Ligada ao X	CGG	*FMR1*	5′ não-traduzida	Causa metilação excessiva levando à expressão reduzida de *FMR1*	< 60	60-200 geralmente não-afetados	> 200
Distrofia miotônica	Autossômica dominante	CTG	*DMPK*	3′ não-traduzida	Obscura?	< 30	50-80 em geral brandamente afetados	80–2.000
Ataxia de Friedreich	Autossômica recessiva	AAG	fataxina	íntron	Interfere no processamento de RNA, levando à expressão reduzida de frataxina	< 34	36-100 (não-interrompida)	> 100

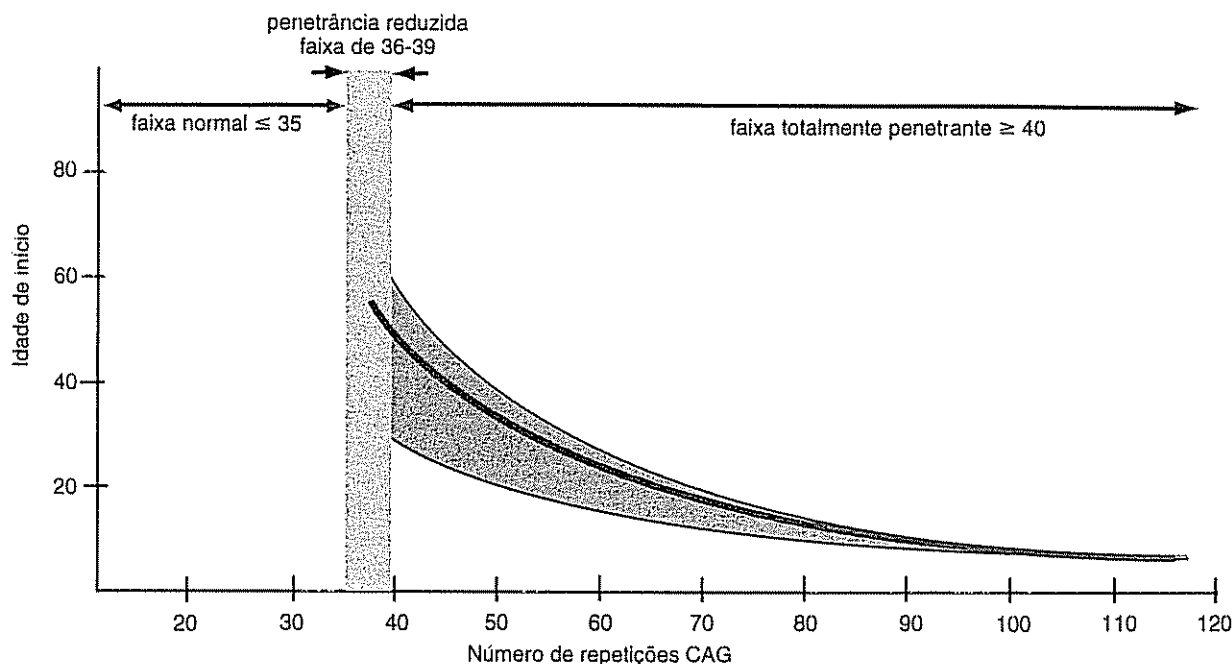



Fig. 12.25 Gráfico correlacionando a idade aproximada de início da doença de Huntington com o número de repetições CAG encontradas no gene *HD*. A linha contínua é a média de idade de início e a área sombreada mostra a faixa da idade de início para cada número de repetições (Dados por cortesia do Dr M Macdonald, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts)

I-1, falecida, foi diagnosticada com HD aos 64 anos e tinha uma expansão de 46 repetições CAG. Seis de seus filhos herdaram o alelo expandido, e em cinco deles a expansão era maior que em I-1. A pessoa II-3, em particular, tinha o maior número de repetições e tornou-se sintomática durante a adolescência. A pessoa II-9, em contraste, herdou um alelo expandido, mas continuou assintomática e desenvolverá a doença em algum momento mais tardio da vida.

Ocasionalmente, as pessoas não-afetadas possuem alelos com tamanhos da repetição no limite superior da faixa normal (de 29 a 35 repetições CAG) que, entretanto, podem se expandir durante a meiose para 40 ou mais repetições. Os alelos com repetições

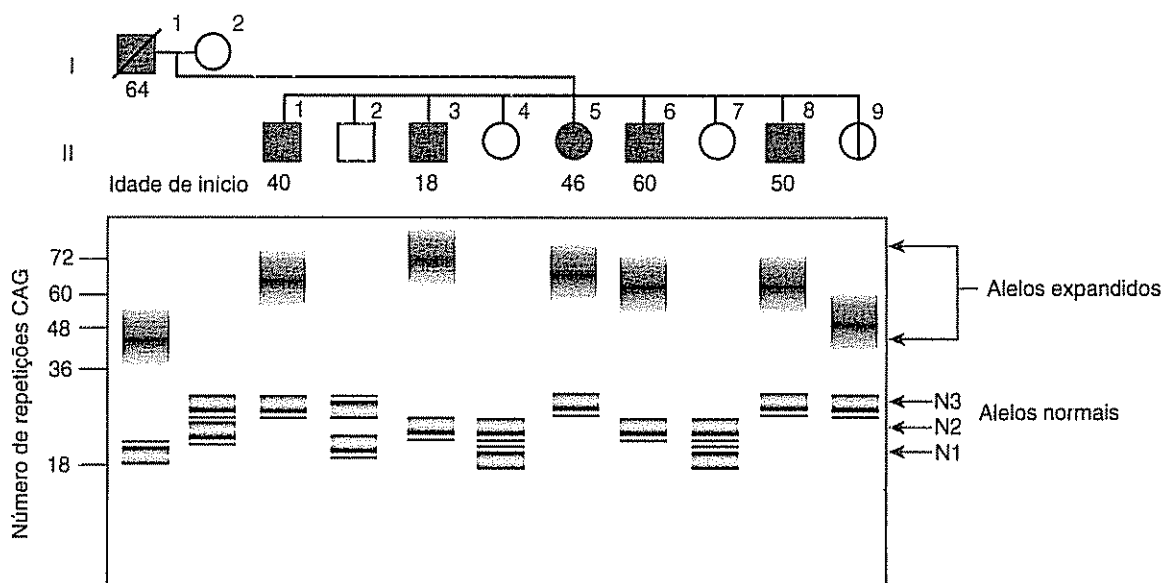



Fig. 12.26 Heredograma de família com doença de Huntington Abaixo um diagrama esquemático de eletroforese em gel Abaixo de cada símbolo das pessoas estão os produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) contendo a repetição CAG derivada de duas cópias do gene *HD* da pessoa A idade dos primeiros sintomas é mostrada abaixo do símbolo de cada indivíduo do heredograma A pessoa I-1 tem uma expansão repetida que sofreu maior expansão quando passada para seis de seus filhos Note que a pessoa II-9 é um portador assintomático de um alelo expandido no qual a doença ainda não teve penetrância (O padrão de banda tripla dos alelos normais e o aspecto mais difuso das bandas dos alelos expandidos resulta de dificuldades técnicas nas amplificações de PCR de uma trinca repetida, bem como de mosaicismo somático ao longo da repetição dos alelos expandidos)

CAG nos limites superiores do normal que não causam doença, mas são capazes de se expandir para a faixa causadora de doença, são conhecidos como **pré-mutações**. A expansão na HD ocorre com mais freqüência durante a gametogênese masculina, o que justifica a forma juvenil mais grave de início precoce da doença, vista com as maiores expansões (de 70 a 121 repetições), é sempre de herança paterna. As repetições expandidas podem continuar a ser instáveis durante a mitose de células somáticas, resultando em algum grau de mosaicismo somático (ver adiante) para o número de repetições em tecidos diferentes do mesmo paciente.

O maior número de pacientes HD conhecido vive na região do Lago Maracaibo, na Venezuela. Estes pacientes são descendentes de um único indivíduo que introduziu o gene na população no início do século XIX. Cerca de 100 pessoas afetadas vivas e outras 900, cada uma com 50% de risco, são atualmente conhecidas na comunidade do Lago Maracaibo. A alta freqüência da doença em uma população local descendente de um pequeno número de indivíduos, um dos quais tinha o gene responsável pela doença, é um exemplo de efeito do fundador (ver Cap. 7).

Aspectos Éticos e Consulta Genética na Doença de Huntington. Como a HD em geral não aparece senão após o fim dos anos reprodutivos, é provável que seja transmitida por pessoas que possuem o gene mutante e não sabem que estão em risco. A descoberta inicial de marcadores geneticamente ligados para HD (ver Cap. 8) e depois do gene *HD* com uma expansão CAG como a causa da doença permite um diagnóstico molecular preciso baseado em marcadores de DNA em pessoas assintomáticas em risco. Como não há tratamento ou cura para a HD, entretanto, e como a doença tem um grave prognóstico, existem importantes implicações éticas associadas à análise molecular e à consulta genética para famílias com a doença. Uma pessoa assintomática em risco tem o dever de se submeter ao teste e saber o resultado antes de se reproduzir? É ético deixar que crianças assintomáticas de famílias com HD sejam testadas? Graves traumas psicológicos, inclusive grave depressão e suicídio, resultaram em pessoas assintomáticas em risco que souberam que tinham a mutação de repetição expandida. Em vista destes e de outros problemas correlatos, os enfoques dos testes pré-sintomáticos de HD estão sendo feitos com cautela e com grande preocupação com os membros familiares descobertos em risco.

Atrofia Muscular Espinobulbar e Outros Distúrbios de Poliglutamina. Além da HD, outras doenças são causadas pelas expansões CAG que codificam poliglutamina, tais como a atrofia muscular espinobulbar recessiva ligada ao X (SBMA) e várias ataxias espinocerebelares autossômicas dominantes. Estas condições diferem no gene envolvido, na faixa normal de repetição, no limiar da doença clínica causada pela expansão e nas regiões do cérebro afetadas. Todas compartilham com a HD a característica fundamental de que resultam de uma instabilidade de um trecho de nucleotídeos CAG repetidos, levando a uma expansão de glutaminas em uma proteína.

O funcionamento normal das proteínas que podem conter as repetições expandidas é amplamente desconhecido, com exceção da SBMA, na qual a expansão ocorre no gene de receptor de hormônio andrógeno. O exemplo da SBMA é importante para a compreensão da patogenia dos distúrbios de poliglutamina, pois já se sabe que a perda completa de função do receptor de andrógeno não leva à SBMA, mas causa insensibilidade androgênica, um defeito no desenvolvimento genital masculino (ver Cap. 10). Assim, é improvável que a perda de função de várias proteínas com poliglutaminas expandidas seja o mecanismo patogênico nestes distúrbios.

Patogenia das Doenças Decorrentes de Expansões $(CAG)_n$. Parece que as proteínas mutantes com poliglutamina expandida são mutantes com propriedades novas (ver Cap. 11), e a expansão confere características à proteína que danificam populações específicas de neurônios e produzem neurodegeneração por um mecanismo tóxico único. Conseqüentemente, as expansões $(CAG)_n$ não são tidas como patogênicas devido ao alongamento do trecho com repetições $(CAG)_n$ no gene correspondente ou nos RNAs produzidos em si.

A cadeia de eventos que leva da via expandida de poliglutamina — que está presente bem cedo na vida dos neurônios afetados — até a morte das células, décadas mais tarde, é desconhecida e é um dos problemas não-resolvidos mais fascinantes na genética humana e médica. Entretanto, vários achados importantes começaram a dar esclarecimentos sobre o problema. Primeiro, apenas um subgrupo de neurônios é afetado, muito embora a proteína mutante (huntingtina) seja amplamente expressa no sistema nervoso, bem como em outros tecidos. Este achado sugere que algumas características da população neuronal afetada a tornam unicamente vulnerável aos efeitos tóxicos da proteína mutante.

Segundo, várias anomalias histológicas foram identificadas nos tecidos afetados (amplamente em modelos de camundongo destas doenças), mas a mais marcante é a presença de inclusões nucleares em algumas das doenças de expansão. As inclusões contêm, além de outras proteínas, a proteína mutante com expansão de poliglutamina e podem refletir eventos de mau dobramento da proteína. Entretanto, embora estas inclusões sejam marcantes, parece que sua formação não é essencial para a morte neuronal. Em pelo menos algumas doenças de expansão de $(CAG)_n$, a localização nuclear da proteína expandida não é necessária para a patogenia. Terceiro, a via expandida de poliglutamina, e não toda a proteína com a via expandida, parece ser suficiente para causar a morte neuronal. Embora um modelo unificador da morte neuronal mediada por poliglutamina expandida não esteja disponível, parece provável que o estudo de modelos animais destes distúrbios virá a fornecer informações cruciais nesta década. Tais informações podem muito bem levar a terapias para evitar ou reverter a patogenia destes distúrbios de evolução lenta.

Síndrome do X Frágil

A **síndrome do X frágil** (Fig. 12.27) é a forma herdável mais comum de retardo mental de moderado a grave, sendo a síndrome de Down a primeira entre todas as causas de retardo mental moderado em homens. A síndrome é tão comum que requer consideração no diagnóstico diferencial de retardo mental em homens e mulheres e está entre as indicações mais freqüentes para a análise de DNA, a consulta genética e o diagnóstico pré-natal. O nome "X frágil" refere-se a um marcador citogenético no cromossomo X em Xq27.3, um "sítio frágil" no qual a cromatina não se condensa apropriadamente durante a mitose (Fig. 12.28). A síndrome do X frágil, que tem uma freqüência de pelo menos 1 em 4.000 nascimentos masculinos, pode responder por grande parte do excesso de homens na população mentalmente retardada.

Fig. 12.27 Face característica de um paciente com a síndrome do X frágil (Foto por cortesia de Michael Partington. Queen's University, Kingston. Ontario.)

A análise genética da síndrome revela alguns achados inesperados que inicialmente foram muito desafiadores, mas que agora podem ser explicados pela descoberta de que o distúrbio é causado por uma mutação dinâmica, uma enorme expansão de outra repetição de trinca, CGG, situada na região 5' não-traduzida do primeiro éxon de um gene chamado *FMR1* (retardo mental 1 de X frágil). O número normal de repetições é superior a 60, enquanto vários milhares de repetições são encontrados em pacientes com a síndrome do X frágil. Mais de 200 cópias da repetição levam a uma metilação excessiva de citosinas no promotor de *FMR1*, uma forma de modificação do DNA que impede o funcionamento normal e extingue a expressão do gene. Uma intensa expansão e metilação também parecem interferir na replicação ou condensação da cromatina, ou ambas, produzindo o sítio frágil cromossômico característico. Esta perda de função do *FMR1* é a causa da síndrome do X frágil, apoiada pelo achado de alguns raros pacientes com a síndrome nos quais as deleções ou uma mutação de sentido trocado aboliram a expressão ou o funcionamento do *FMR1*.

Fig. 12.28 O sítio X frágil em Xq27 3 associado a retardo mental ligado ao X

A comparação da HD (e outras doenças neurodegenerativas de poliglutamina) com a síndrome do X frágil revela algumas similaridades, mas também muitas diferenças. Embora as expansões de repetições de trincas estejam envolvidas em ambos os tipos de doença, a expansão nas doenças de poliglutaminas é na região codificante e varia de 40 a 120 cópias de CAG, enquanto a repetição na síndrome do X frágil é uma CGG na parte não-traduzida 5' de um gene, e expansões de 200 a muitos milhares são vistas em pacientes afetados pelo distúrbio. Segundo, as doenças neurodegenerativas de poliglutamina e a síndrome do X frágil diferem porque a síndrome do X frágil deve-se à perda de função de um gene, e não à toxidez de uma proteína anormal. Terceiro, os indivíduos assintomáticos portadores de expansões pré-mutacionais e o fenômeno de antecipação são vistos em ambas as doenças. Entretanto, o número de repetições nos alelos pré-mutação de *FMR1* varia de 60 a 200 cópias, muito maior que na HD, e a expansão dos alelos de pré-mutação ocorre na *mulher*, e não na linhagem germinativa masculina. Finalmente, o grau de instabilidade mitótica na síndrome do X frágil é muito maior que aquela vista na HD e resulta em variabilidade muito maior nos números de repetições encontradas entre células do mesmo tecido e entre tecidos somáticos diferentes em um mesmo indivíduo.

Distrofia Miotônica

Uma terceira doença de expansão de repetição de trinca é a **distrofia miotônica**, uma miopatia dominante autossômica caracterizada por miotonia, distrofia muscular, cataratas, hipogonadismo, calvície frontal e mudanças no eletroencefalograma. A doença é notória pela falta de penetrância e por sua expressão variável tanto na gravidade clínica quanto na idade de manifestação (Fig. 12.29). Uma forma de distrofia miotônica, a forma congênita, é particularmente grave e pode ameaçar a vida, bem como causar retardo mental. Cada filho com a forma congênita resulta de uma mãe afetada, sendo que ela mesma pode ter apenas uma expressão branda da doença e pode não saber que é afetada. Assim, os heredogramas de distrofia miotônica, como os de HD e da síndrome do X frágil, apresentam uma clara evidência de antecipação.

Algumas, mas nem todas, das intrigantes características da herança da distrofia miotônica podem ser explicadas pela descoberta de que a doença está associada a uma ampliação de repetição da trinca CTG na região não-traduzida 3' de um gene de cinase proteica (*DMPK*) no cromossomo 19. A faixa normal de repetições no *DMPK* é de 5 a 30. As pessoas afetadas de forma branda têm de 50 a 80 cópias, e várias pessoas afetadas têm mais de 2.000 cópias. Qualquer um dos genitores pode transmitir uma cópia ampliada, mas os homens podem transmitir até 1.000 cópias da repetição, enquanto grandes expansões, contendo muitos milhares de repetições, ocorrem apenas na gametogênese feminina. Como a distrofia miotônica congênita deve-se a expansões enormes (muitos milhares), esta forma de distrofia miotô-

Fig. 12.29 Distrofia miotônica, uma condição autossômica dominante com expressividade variável em gravidade clínica e idade de início. Nesta família, a avó (*esquerda*) teve catarata bilateral, mas não a fraqueza facial ou os sintomas musculares. Sua filha foi tida como não-afetada até o nascimento de seu filho gravemente afetado, mas ela agora apresenta uma fraqueza facial moderada e ptose, com miotonia, e submeteu-se à extração de catarata. A criança tem distrofia miotônica congênita. (De Harper P S [1989] Myotonic Dystrophy. 2.ª ed. WB Saunders, Philadelphia, p. 18.)

nica é quase sempre de origem materna. Não sabemos se a expansão de CAG no gene *DMPK* causa a doença interferindo na expressão do próprio *DMPK*, na expressão de outros genes vizinhos, ou ambos.

Ataxia de Friedreich

A **ataxia de Friedreich**, uma ataxia espinocerebelar, constitui uma quarta categoria de doenças por repetição de trinca (ver Quadro 12.12). A doença é autossômica recessiva, em contraste com a HD, a distrofia miotônica e a síndrome do X frágil. O distúrbio normalmente se manifesta antes da adolescência e em geral é caracterizado por movimentos descoordenados dos membros, dificuldade de fala, diminuição ou ausência de reflexos, prejuízo posicional e de sensações vibratórias, escoliose e deformidades dos pés. Na maioria dos casos, a ataxia de Friedreich é causada por ampliação de outra repetição de trincas, AAG, situada em um íntron de um gene que codifica uma proteína mitocondrial chamada frataxina, envolvida no metabolismo do ferro. Nas pessoas normais, o tamanho da repetição varia de 7 a 34 cópias, enquanto a expansão da repetição nos pacientes está entre 100 e 1.200 cópias. A expansão dentro do íntron interfere na expressão normal do gene de frataxina. Como a ataxia de Friedreich é recessiva, é necessário que haja perda de expressão de ambos os alelos para que a doença ocorra. De fato, alguns pacientes são conhecidos como heterozigotos compostos, nos quais um alelo tem a mutação de repetição AAG intrônica ampliada e o outro uma mutação de nucleotídeo.

Doenças de DNA Mitocondrial e Herança Materna

A Molécula de mtDNA. Como foi descrito no Cap. 3, nem todo o RNA e a proteína sintetizada em uma célula são codificados pelo DNA do núcleo. Uma pequena mas importante fração é codificada por genes dentro do genoma mitocondrial. Este genoma, cuja seqüência completa foi relatada em 1981, tem aproximadamente 16,5 kb de tamanho (Fig. 12.30). O DNA mitocondrial (mtDNA) é embalado em um cromossomo circular dentro da organela mitocondrial, não no núcleo. A molécula compacta de mtDNA contém 37 genes. Os genes codificam dois tipos de RNA ribossômico, 22 tRNAs e 13 polipeptídeos que são subunidades de enzimas de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Os outros 74 polipeptídeos do complexo OXPHOS são codificados pelo genoma nuclear. Assim, as doenças de OXPHOS podem ser decorrentes de mutações no genoma de mtDNA ou de mutações nos genes nucleares que codificam os componentes de OXPHOS. A maioria das células contém pelo menos 1.000 moléculas de mtDNA, distribuídas entre centenas de mitocôndrias individuais. Uma marcante exceção é o ovócito maduro, que tem mais de 100.000 cópias de mtDNA, compreendendo cerca de um terço do conteúdo total de DNA destas células.

Funções da Fosforilação Oxidativa e Doenças de mtDNA. O complexo OXPHOS é central para três das principais funções das mitocôndrias. A alteração destas atividades, decorrente de mutações no mtDNA, provavelmente é subjacente à disfunção celular e à morte celular que ocorrem nas doenças de mtDNA. A função primária do OXPHOS é produzir energia para a célula. A formação diminuída de ATP caracteriza muitas doenças de mtDNA. Uma segunda função de OXPHOS é gerar espécies reativas de oxigênio, como subproduto de OXPHOS. O aumento de produção destas espécies ocorre em alguns defeitos de OXPHOS, um fator que também contribui para a morte celular. Terceiro, as mitocôndrias integram muitos sinais que iniciam a apoptose. Este processo usa alguns polipeptídeos de OXPHOS, e as mutações no mtDNA podem aumentar a predileção pela apoptose. A miopatia mitocondrial em geral associada a mutações de mtDNA é

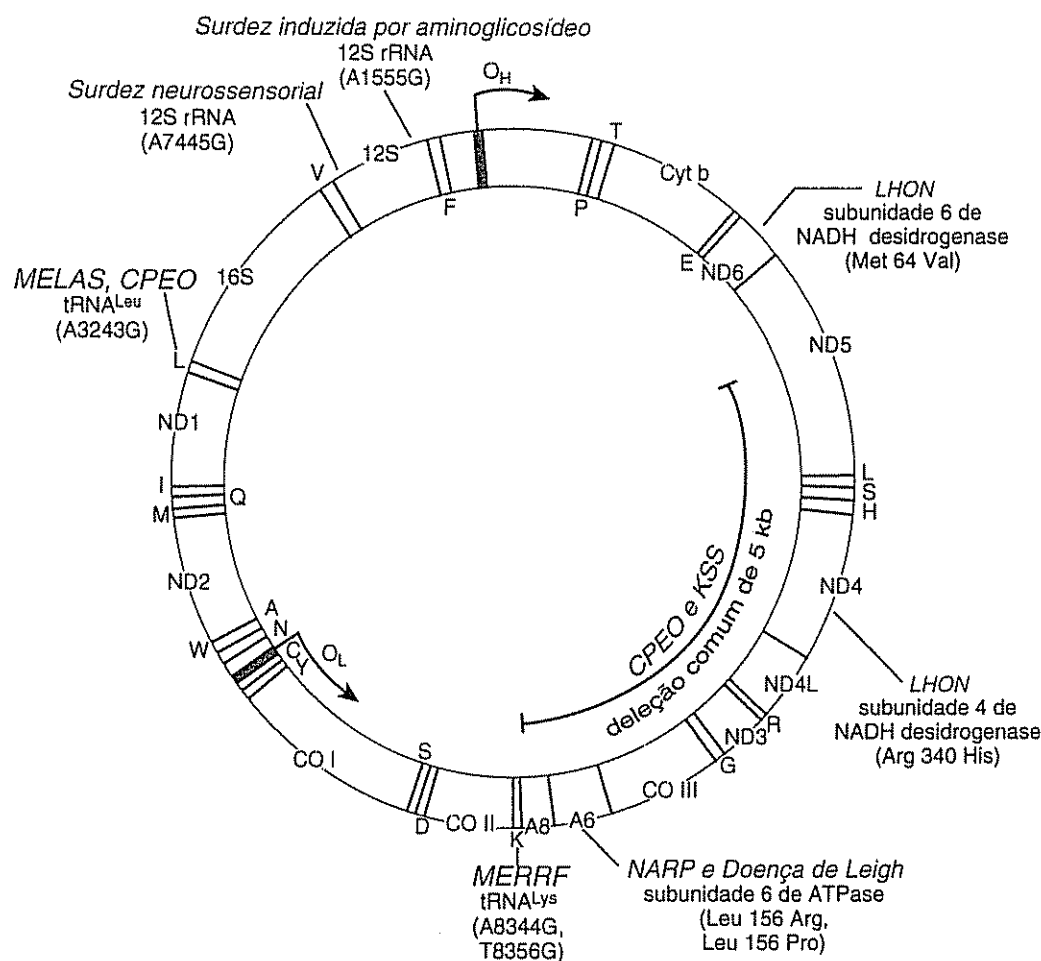



Fig. 12.30 A molécula de DNA mitocondrial mostrando a localização dos genes codificantes de 22 tRNAs, dois rRNAs e 13 proteínas do complexo de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Algumas das substituições mais comuns causadoras de doença e deleções no genoma de mtDNA também são ilustradas. O_H e O_L são as origens de replicação dos dois filamentos de DNA, respectivamente; 12S = RNA ribossomal 12S; 16S = RNA ribossomal 16S. Os tRNAs são indicados pelo código de uma letra para seus aminoácidos correspondentes (p. ex., L para leucina, K para lisina, e assim por diante). Os polipeptídeos 13 OXPHOS codificados pelo mtDNA incluem componentes do *Complexo I*: NADH desidrogenase (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6); *Complexo III*: citocromo *b* (Cit *b*); *Complexo IV*: citocromo *c* oxidase I ou Cit *c* (COI, COII, COIII); e *Complexo V*: ATPase 6 (ATP-6, ATP-8). As abreviações de doenças usadas nas figuras (p. ex., MELAS, MERRF) são explicadas no Quadro 12.13. (Adaptada em parte de Shoffner J. M., Wallace D. C. [1995] Oxidative phosphorylation disease. *In* Scriever C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. [eds] The Metabolic Bases of Inherited Disease, 7.ª ed. McGraw-Hill, New York. O conceito de ilustrar as mutações na molécula de mtDNA surgiu de Johns D. R. [1995] Mitochondrial DNA and disease. New Engl J Med 333: 638-644.)

caracterizada pelas chamadas fibras vermelhas anfractuadas, um fenótipo histológico causado por degeneração das fibras musculares e proliferação de mitocôndrias musculares anormais.

A Genética das Doenças de mtDNA

As primeiras mutações patogênicas no mtDNA foram identificadas no início da década de 1990. Inesperado e ainda inexplicado é o fato de que o genoma de mtDNA muta a uma taxa cerca de 10 vezes maior que o DNA nuclear. A gama de doenças clínicas resultantes de mutações no mtDNA é diversa (Fig. 12.31), embora predomine a doença neuromuscular. Mais de 100 rearranjos diferentes e 50 mutações de ponto que são relacionadas a doenças foram identificados no mtDNA. As mutações representativas e as doenças a elas associadas são apresentadas na Fig. 12.30 e no Quadro 12.13. Três tipos de mutações foram identificados no mtDNA: (1) mutações de sentido trocado nas regiões codificantes dos genes que alteram a atividade de uma proteína OXPHOS; (2) mutações de ponto nos genes de tRNA ou rRNA que prejudicam a síntese de proteínas mitocondriais e (3) rearranjos que geram deleções ou duplicações da molécula de mtDNA.

Como indicado no Cap. 5, alguns heredogramas de doenças herdadas que não podiam ser explicadas por herança mendeliana típica de genes nucleares são hoje conhecidas como sendo causadas por mutações no mtDNA e por manifestar herança materna. Os distúrbios causados por mutações no mtDNA demonstram várias características incomuns que resultam de aspectos únicos da biologia e do funcionamento mitocondrial.

Herança Materna do mtDNA

Uma característica particular da genética do mtDNA, comparada com o genoma nuclear, é sua **herança materna**. Em contraste com a abundância de mitocôndrias em cada ovócito, os es-

QUADRO 12–13

Exemplos Representativos de Distúrbios Decorrentes de Mutações no DNA Mitocondrial e sua Herança

Doença	Fenótipo	Mutação mais Freqüente na Molécula de mtDNA	Homoplasmia *versus* Heteroplasmia	Herança
Neuropatia óptica hereditária de Leber	Morte rápida do nervo óptico, levando à cegueira na vida adulta jovem	Substituição Arg340His no gene *ND1* do complexo I da cadeia de transporte de elétrons; outras mutações de sentido trocado do complexo I	Homoplásmica (geralmente)	Materna
NARP, doença de Leigh	Neuropatia, ataxia, retinite pigmentosa, retardo de desenvolvimento, retardo mental, acidemia lática	Mutações de ponto na subunidade ATPase do gene 6	Heteroplásmica	Materna
MELAS	Encefalopatia mitocondrial, acidose lática e episódios tipo derrame; pode se manifestar apenas como diabetes melito	Mutação de ponto no $tRNA^{Leu}$	Heteroplásmica	Materna
MERRF	Epilepsia mioclônica, fibras vermelhas anfractuadas no músculo, ataxia, surdez neurossensorial	Mutação de ponto no $tRNA^{Lis}$	Heteroplásmica	Materna
Surdez	Surdez neurossensorial progressiva, em geral induzida por antibióticos aminoglicosídicos	Mutação A1555G no rRNA 12S	Homoplásmica	Materna
	Surdez neurossensorial não-sindrômica	Mutação A7445G no rRNA 12S	Homoplásmica	Materna
Oftalmoplegia externa progressiva crônica (CPEO)	Fraqueza progressiva dos músculos extra-oculares	A mutação de ponto MELAS comum no $tRNA^{Lis}$; grandes deleções similares à KSS	Heteroplásmica	Materna, se mutações de ponto
Síndrome de Pearson	Insuficiência pancreática, pancitopenia, acidose lática	Grandes deleções	Heteroplásmica	Mutações somáticas, esporádicas
Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)	PEO de início precoce com bloqueio cardíaco, pigmentação da retina	Grande deleção de 5 kb	Heteroplásmica	Mutações somáticas, esporádicas

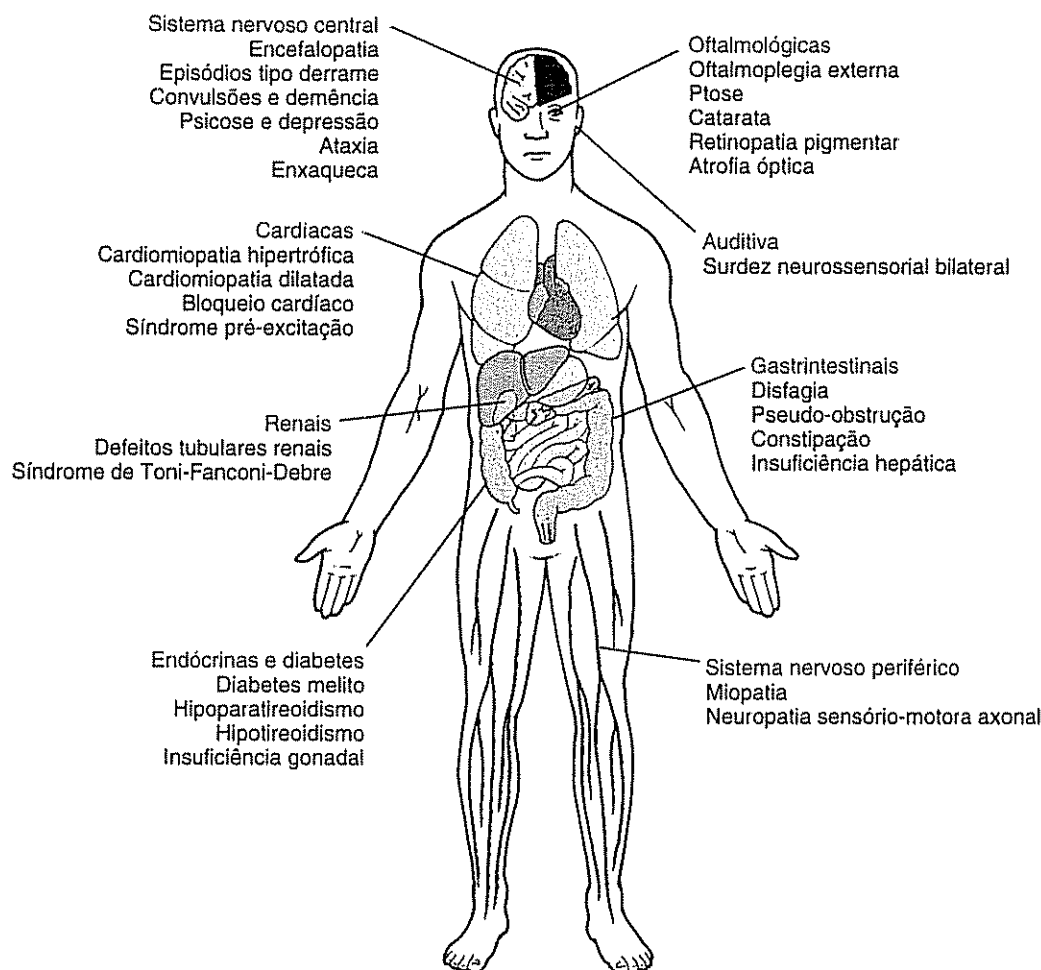



Fig. 12.31 A gama de tecidos afetados e fenótipos clínicos associados a mutações no mtDNA (Modificado de Chinnery P F, Turnbull D M [1999] Mitochondrial DNA and disease Lancet 354:SI17-SI21)

permatozóides contêm poucas mitocôndrias, e estas poucas não passam para a prole. Uma criança, portanto, herda todo o seu mtDNA da mãe e nada do pai. Suas filhas, por sua vez, transmitem o mtDNA, mas seus filhos não. Assim, todos os filhos de uma *mulher* com uma mutação no mtDNA herdam a mutação, enquanto nenhuma prole de um *homem* portador da mesma mutação herdará o DNA defeituoso. Um exemplo de um heredograma que manifesta herança materna de uma mutação no mtDNA que causa **neuropatia óptica hereditária de Leber** (LHON) é mostrado na Fig. 12.32.

Homoplasmia e Heteroplasmia

Uma segunda característica única da genética do mtDNA surge do fato de que a maioria das células contém, como já foi mencionado, mais de 1.000 moléculas de mtDNA. Quando surge uma mutação no mtDNA, ela primeiro se apresenta em apenas uma das moléculas de mtDNA de uma mitocôndria. Quando a mitocôndria se divide por simples fissão, cada molécula de mtDNA replica-se dentro da mitocôndria. As moléculas de mtDNA distribuem-se aleatoriamente entre as novas organelas, e as mitocôndrias distribuem-se aleatoria-

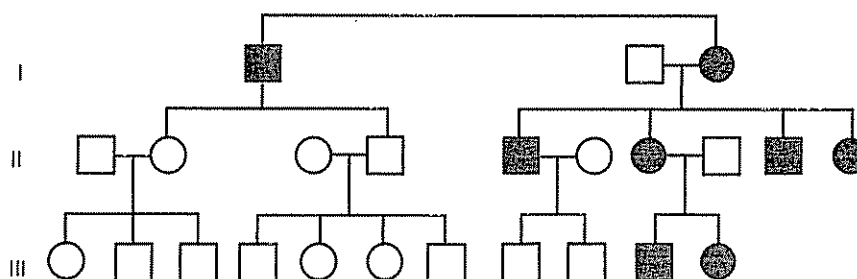



Fig. 12.32 Heredograma da neuropatia óptica hereditária de Leber, um distúrbio causado por um defeito no DNA mitocondrial. A herança é apenas pela linhagem materna, de acordo com a conhecida herança materna de DNA mitocondrial. Nenhum homem afetado transmite a doença

mente entre as células filhas. Assim, quando uma célula contendo uma mistura de mtDNAs normais e mutantes se divide, suas células filhas podem, por acaso, receber mitocôndrias que contêm apenas uma população pura de mtDNA normal ou uma população pura de mtDNA mutantes (uma situação conhecida como **homoplasmia**). Alternativamente, a célula filha pode receber uma mistura de mitocôndrias, algumas com e outras sem a mutação (**heteroplasmia**) (Fig. 12.33). Como a expressão fenotípica de uma mutação no mtDNA depende das proporções relativas de mtDNA normal e mutante nas células que constituem tecidos diferentes, a penetrância reduzida, a expressividade variável e a pleiotropia são todas características típicas de heredogramas de distúrbios mitocondriais.

A heteroplasmia está associada a três características adicionais da genética do mtDNA que são de significado médico. Primeiro, as moléculas de mtDNA deletadas, uma classe comum de mutação de mtDNA que será discutida mais adiante, em geral não são transmitidas por mães clinicamente afetadas para seus filhos (os motivos desta exclusão não estão claros). Por outro lado, as mulheres portadoras de mutações de ponto de mtDNA heteroplásmico, ou de duplicações do mtDNA, em geral transmitem alguns mtDNAs mutantes para sua prole. Segundo, o número de moléculas de mtDNA dentro de cada ovócito é reduzido antes de ser subseqüentemente ampliado para o enorme total visto nos ovócitos maduros. Esta restrição e subseqüente ampliação de mtDNA durante a ovocitogênese é chamada de **"gargalo genético" mitocondrial**. Em conseqüência, a variabilidade na porcentagem de moléculas de mtDNA mutante vista na prole de uma mãe portadora de mutação em mtDNA surge, pelo menos em parte, pela amostragem de apenas um subgrupo de mtDNAs durante a ovocitogênese. Terceiro, a despeito da variabilidade no grau de heteroplasmia que surge deste "gargalo", as mães com uma alta proporção de moléculas mutantes de mtDNA são mais propensas a ter prole clinicamente alterada que as mães com uma proporção menor.

Interação de Genomas Mitocondriais e Nucleares. Como tanto os genomas nuclear quanto mitocondrial contribuem com polipeptídeos para OXPHOS, não é surpreendente que os fenótipos associados a mutações nos genes nucleares em geral sejam indistinguíveis daqueles decorrentes de mutações no mtDNA. A evidência genética demonstrou, entretanto, que existe uma relação mais direta entre os genomas nuclear e mtDNA. A primeira indicação desta interação foi fornecida pela identificação da síndrome de **deleções no mtDNA transmitidas autossomicamente**, cujo fenótipo se assemelha à oftalmoplegia externa progressiva crônica (CPEO) (ver Quadro 12.13). Pode ser necessário mais de um gene autossômico para a integridade do mtDNA normal, pois tanto a forma autossômica dominante quanto a forma autossômica recessiva desta síndrome já foram reconhecidas. Uma segunda doença autossômica rara demonstrou que pelo menos um gene nuclear regula a abundância de moléculas de mtDNA. Este distúrbio, chamado de **síndrome de depleção de mtDNA**, é caracterizado por uma redução quantitativa no número de cópias de mtDNA em vários tecidos. O fenótipo clínico inclui miopatia, bem como outras características também encontradas nas doenças de mtDNA.

Fenótipo nos Distúrbios Mitocondriais

As mutações mitocondriais em geral afetam os tecidos que precisam de uma fosforilação oxidativa intata para atender às altas demandas de energia metabólica. Assim, as doenças mitocondriais com freqüência envolvem o sistema neuromuscular e produzem encefalopatia, miopatia, ataxia, degeneração da retina e perda de funcionalidade dos músculos oculares externos. O espectro de doenças mitocondriais é muito amplo, entretanto, e, como ilustrado na Fig. 12.31, pode incluir dis-

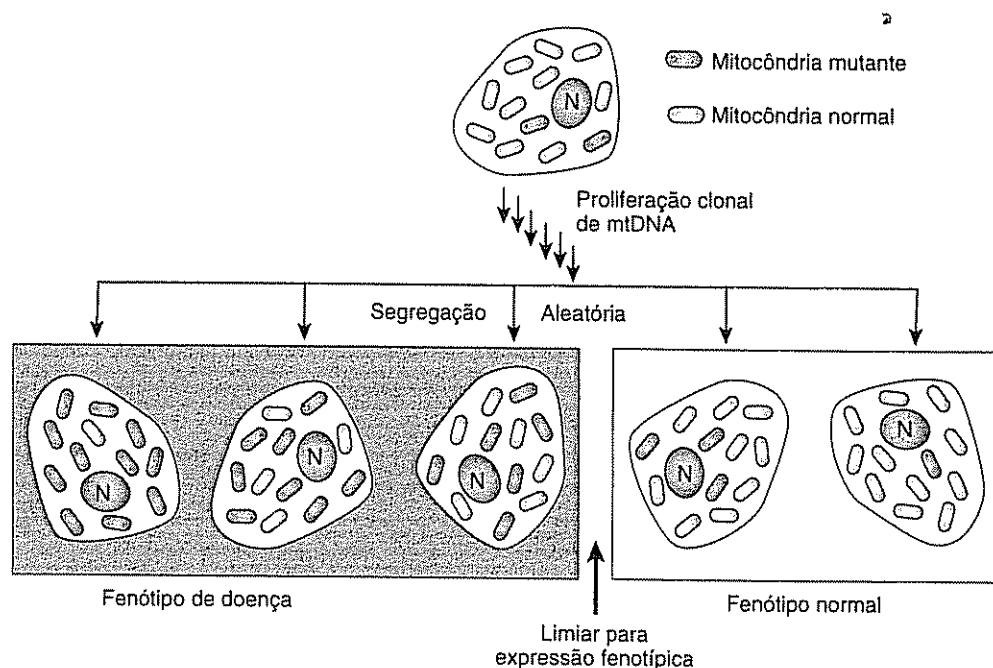



Fig. 12.33 Segregação replicativa de uma mutação mitocondrial heteroplásmica. A repartição aleatória de mitocôndrias mutantes e tipo selvagem por rodadas múltiplas de mitose produz uma coleção de células filhas com ampla variação na proporção de mitocôndrias mutantes e tipo selvagem levadas em cada célula. Resultam disfunções celulares e tissulares quando a fração de mitocôndrias portadoras da mutação excede um limiar.

função hepática, insuficiência de medula óssea, deficiência de células das ilhotas e diabetes, surdez, bem como outros distúrbios.

O grau de distribuição de heteroplasmia contribui significativamente para a pleiotropia e a expressividade variável vistas nas mutações de mtDNA (ver Fig. 12.33 e Quadro 12.13). Por exemplo, em uma única família, uma população de mtDNA mutante pode estar associada a diabetes e surdez em uma pessoa e grave encefalopatia e convulsões em outra. Uma ilustração similar é dada pelo que parece ser a mais comum mutação de mtDNA (sua freqüência na população finlandesa é de 1/7.000 pessoas), a mutação A3243G no gene de $tRNA^{leu}$ (a nomenclatura refere-se ao nucleotídeo normal na posição 3243 da molécula de mtDNA, seguido do nucleotídeo substituído). Esta mutação em geral está associada ao fenótipo chamado de MELAS (ver Fig. 12.30 e Quadro 12.13), um acrônimo para *e*ncefalomiopatia *m*itocondrial com *a*cidose *l*ática e episódios tipo derrame (*strokelike*). Em algumas famílias, entretanto, esta mutação causa predominantemente diabetes e surdez, em outras há CPEO (ver Quadro 12.13) e outras, ainda, apresentam cardiomiopatia. Em adição, entre 0,5% a 1,5% dos casos de diabetes melito da população em geral têm sido atribuídos à substituição A3243G.

Em algumas doenças de mtDNA, tais como a **epilepsia mioclônica com fibras vermelhas anfractuadas** (ver Quadro 12.13), a heteroplasmia é comum. A herança materna ocorre, mas agora há uma complexidade adicional ao padrão de herança e ao fenótipo porque cada criança herdará números variáveis de mitocôndrias com a mutação. Finalmente, a heteroplasmia é a regra na síndrome de Kearns-Sayre e na síndrome de Pearson (ver Quadro 12.13). Estes distúrbios ocorrem como casos esporádicos na família, e não há herança materna do distúrbio porque cada paciente representa uma mutação nova no DNA mitocondrial.

As Doenças no mtDNA São Multifatoriais. Embora a heteroplasmia seja a principal fonte de variabilidade fenotípica nas doenças de mtDNA, fatores adicionais também devem desempenhar um papel. Uma forte evidência para a existência de tais fatores é fornecida pelas famílias portadoras de mutações associadas à LHON, uma condição na qual as mutações em geral são homoplásmicas. A LHON expressa-se fenotipicamente como uma perda rápida e bilateral da visão central causada pela morte do nervo óptico em adultos jovens. As pessoas afetadas podem ser homens ou mulheres, mas há um aumento marcante e inexplicado na penetrância da doença em homens: de 80% a 90% dos homens portadores em heredogramas caucasianos desenvolvem perda visual, mas apenas de 8% a 32% das mulheres são afetadas. O fato de que as mutações LHON raramente são associadas a qualquer fenótipo fora do olho, bem como a penetrância variável influenciada pelo sexo, dão uma evidência direta de que a LHON é de origem multifatorial. Além disso, tanto o álcool quanto o tabaco são importantes fatores ecogenéticos associados ao aumento de probabilidade de cegueira nos portadores de mutações LHON.

DOENÇAS FARMACOGENÉTICAS

A incidência geral de reações adversas a drogas, pelo menos nos hospitais dos EUA, é de cerca de 6,7%. As reações fatais a drogas ocorrem com uma incidência de cerca de 0,3%. Estas reações não-antecipadas a medicamentos são muito, se não totalmente, determinadas por fatores genéticos. A **farmacogenética** é a área especial da genética bioquímica que lida com a variabilidade na resposta a drogas que é decorrente de variação genética. Em seu sentido restrito, a farmacogenética pode ser restrita às variações genéticas que alteram a habilidade do corpo no que diz respeito a absorver, transportar, metabolizar ou excretar drogas ou seus metabólitos. Em termos mais amplos e mais úteis, a farmacogenética inclui qualquer variação geneticamente determinada em resposta a drogas. Este tipo de variação inclui, por exemplo, o efeito dos barbituratos em precipitar uma doença clínica em pessoas com porfiria intermitente aguda (ver mais adiante), bem como o efeito do uso de álcool por mulheres grávidas sobre a incidência da síndrome do álcool fetal. Cinco exemplos de importantes variações farmacogenéticas são descritos resumidamente nesta seção.

A origem dos polimorfismos de respostas a drogas e os mecanismos pelos quais eles são mantidos geram um problema interessante. Eles obviamente não se desenvolveram em resposta a drogas, pois antecedem as respectivas drogas. Lidar com as drogas, bem como responder a elas, requer muitas reações bioquímicas, e as enzimas envolvidas podem participar do metabolismo de substâncias comuns nos alimentos. Sugeriu-se que estes polimorfismos surgiram como resultado de pressões seletivas dietéticas diferentes em populações diferentes. Esta visão é apoiada pela distribuição geográfica de muitos destes alelos.

Reconhecendo que há uma variação normal em resposta a drogas, os farmacologistas definem a "potência" de uma droga pela dose que produz um determinado efeito em 50% da população. Para características genéticas, a variação contínua em geral é mais bem explicada com base na herança multifatorial ou por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, como discutido no Cap. 15. Mas a resposta às drogas também pode apresentar variação descontínua, com grandes distinções entre graus diferentes de resposta. O achado de uma distribuição populacional bimodal ou trimodal da atividade de uma enzima do metabolismo de uma droga pode indicar que a enzima é codificada por alelos em um único locus polimórfico.

Problemas Genéticos na Anestesia

Hipertermia Maligna

A hipertermia maligna é uma condição autossômica dominante na qual pode haver uma resposta adversa intensa à administração de todos os anestésicos de inalação comumente usados (p. ex., halotano) e relaxantes musculares tais como o cloreto de succinilcolina, desenvolvimento de uma temperatura muito alta, parada de contração muscular e hipercatabolismo. A condição é uma causa importante, se não comum, de morte na anestesia, com uma incidência que é maior em crianças (1 em 12.000) que em adultos (1 em 100.000). Curiosamente, os homens com hipertermia maligna superam as mulheres, 2,5 para 1, uma diferença que provavelmente tem base hormonal.

A anomalia fisiológica fundamental na doença é um nível elevado de cálcio ionizado no sarcoplasma do músculo. Este aumento leva a uma rigidez muscular, à elevação da temperatura corpórea e a outras anomalias. A maioria dos casos de hipertermia maligna está associada a mutações em um gene chamado *RYR1*, codificando o canal de liberação de cálcio. O gene *RYR1* está mapeado no cromossomo 19. A análise de ligação indica que as mutações em *RYR1* são responsáveis por apenas cerca de 50% dos casos, e até o momento as mutações neste gene foram encontradas em 40% das famílias com hipertermia maligna. Vá-

rios outros loci para hipertermia foram identificados e em um caso encontrou-se uma mutação no gene *CACNL1A3*, que codifica a subunidade α-1 do receptor de diidropiridina.

A necessidade de precauções especiais quando uma pessoa em risco precisa de anestesia é óbvia. O sódio dantrolene é efetivo quanto a evitar ou reduzir a gravidade da resposta se ocorrer um ataque insuspeito, e anestésicos alternativos podem ser dados aos pacientes em risco.

Colinesterase Sérica e Sensibilidade à Succinilcolina

A colinesterase sérica é uma enzima do plasma humano que tem a propriedade de hidrolisar os ésteres de colina, tais como a acetilcolina. A função normal da enzima é obscura, mas sua total ausência é compatível com a saúde normal. Portanto, ela não deve ter um papel fisiológico importante. Um relaxante muscular muito usado, a succinilcolina (que é usada como auxiliar à anestesia geral), é composto de duas moléculas de acetilcolina e normalmente é hidrolisado pela colinesterase, um processo que reduz a quantidade de succinilcolina que atinge os terminais das placas motoras. Esta hidrólise é considerada na dosagem dada a um paciente comum. Entretanto, pelo menos nas populações européias, cerca de 1 em 3.300 pessoas é homozigota para um alelo atípico de colinesterase. Sendo incapaz de degradar a succinilcolina em uma taxa normal, os homozigotos respondem anormalmente à sua administração com uma apnéia prolongada (que dura de 1 a várias horas) e requerem suporte respiratório artificial.

Genética. O gene alterado na sensibilidade à succinilcolina é o de butirilcolinesterase (*BCHE*), situado no cromossomo 3. Os principais determinantes da atividade de colinesterase no plasma são dois alelos co-dominantes do gene *BCHE*, conhecidos como alelos "usual" (*U*) e "atípico" (*A*). O alelo atípico é o resultado de uma mutação de sentido trocado (Asp70Gli). Outro alelo de substituição de sentido trocado, a variante K, também é comum, mas os homozigotos *K/K* têm um aumento de sensibilidade à succinilcolina. Os compostos genéticos dos alelos *A* e *K*, por outro lado, às vezes são sensíveis e às vezes não, mas os fatores responsáveis por esta variação não são claros. A deficiência de colinesterase em geral se deve à homozigose do alelo atípico. A enzima produzida pelos homozigotos é qualitativamente alterada e tem menor atividade que o tipo usual. Outras variantes raras de *BCHE* que conferem sensibilidade à succinilcolina também foram identificadas.

A identificação das substituições específicas que estão presentes nos alelos de colinesterase permite a genotipagem precisa dos pacientes, a determinação do significado clínico da variante *K* e a melhoria da análise de heredogramas e da consulta genética.

Outras Doenças Farmacogenéticas Importantes

O Polimorfismo de Acetilação

Este importante polimorfismo farmacogenético foi descoberto durante o tratamento da tuberculose com a droga isoniazida, quando uma alta incidência de neuropatia periférica foi observada. Após uma dose de teste, a taxa de desaparecimento da isoniazida do plasma apresentou uma distribuição bimodal na população, permitindo a identificação das pessoas como acetiladores rápidos ou lentos (inativadores da droga). Hoje está claro que os fenótipos de inativação lenta e rápida são primariamente devidos a diferenças alélicas em um gene de *N*-acetiltransferase, *NAT2*, que está mapeado no cromossomo 8. Foram descritos três alelos principais de acetilação lenta, juntamente com um grande número de alelos *NAT2* raros. Os acetiladores lentos têm uma diminuição substancial na quantidade de *N*-acetiltransferase no fígado e são homozigotos para os alelos recessivos neste locus. Os inativadores rápidos são homozigotos ou heterozigotos normais. Um segundo gene de *N*-acetiltransferase, *NAT1*, também foi identificado no cromossomo 8. Um só polimorfismo de acetilação lenta foi identificado neste gene. As freqüências dos alelos de acetilação lenta têm diferenças étnicas marcantes: por exemplo, uma minoria (de 5% a 20%) dos asiáticos tem o fenótipo de acetilação lenta, enquanto 50% dos afro-americanos e até 65% dos caucasianos são homozigotos para acetilação lenta. Em algumas populações mediterrâneas, a freqüência de acetiladores lentos é maior que 90%.

Significado. Além de seu efeito na inativação de isoniazida, o fenótipo de acetilação afeta a disposição de uma ampla variedade de outras drogas e xenobióticos. Por exemplo, os acetiladores rápidos não só têm uma taxa de falha maior com a terapia semanal de isoniazida para tuberculose, mas também requerem doses maiores de hidralazina para controlar a hipertensão e de dapsona para tratar a hanseníase e outras infecções. Contrariamente, os acetiladores lentos correm um risco aumentado de desenvolver uma síndrome tipo *lupus* eritematoso sistêmico induzida por drogas quando recebem hidralazina, reações hematológicas adversas após tratamento com isoniazida e respostas adversas idiossincráticas induzidas por sulfonamida. Além disso, os acetiladores lentos expostos a arilaminas carcinogênicas (p. ex., benzidina) têm uma incidência aumentada de câncer de bexiga e, nas mulheres fumantes após a menopausa, câncer de mama.

Porfiria Intermitente Aguda: Alterações Relacionadas a Drogas na Regulação da Expressão Gênica

A **porfiria intermitente aguda** é uma doença autossômica dominante associada à disfunção neurológica intermitente. Os episódios clínicos são iniciados por um grande número de medicações, hormônios esteróides e inanição. Como descreveremos, a regulação alterada dos genes que controlam a síntese de hemo é responsável pela fisiopatologia.

O defeito primário na porfiria intermitente aguda é uma deficiência de porfobilinogênio (PBG) desaminase, uma enzima na via biossintética do hemo (Fig. 12.34). Todos os pacientes com porfiria intermitente aguda, seja sua doença clinicamente latente (e ela permanece latente durante a vida na grande maioria dos pacientes, cerca de 90%) ou expressa (cerca de 10%), têm uma redução de aproximadamente 50% na atividade enzimática de PBG desaminase. Esta redução é compatível com a herança autossômica dominante

A expressão clínica da doença ocorre em resposta a eventos que diminuem a concentração de hemo na célula hepática. As drogas que não são seguras para os pacientes incluem, por exemplo, os barbituratos, alguns hormônios esteróides e várias outras substâncias químicas. A exposição a estes compostos aumenta a síntese de citocromos hepáticos P450, uma classe de proteínas contendo hemo. Como resultado, o nível celular de hemo cai, reduzindo a inibição *feedback* de hemo na síntese do ácido δ-aminolevulínico, a etapa limitadora de velocidade na via de síntese do hemo (Fig. 12.34). O aumento de expressão da sintase é obtido tanto por mecanismos transcricionais

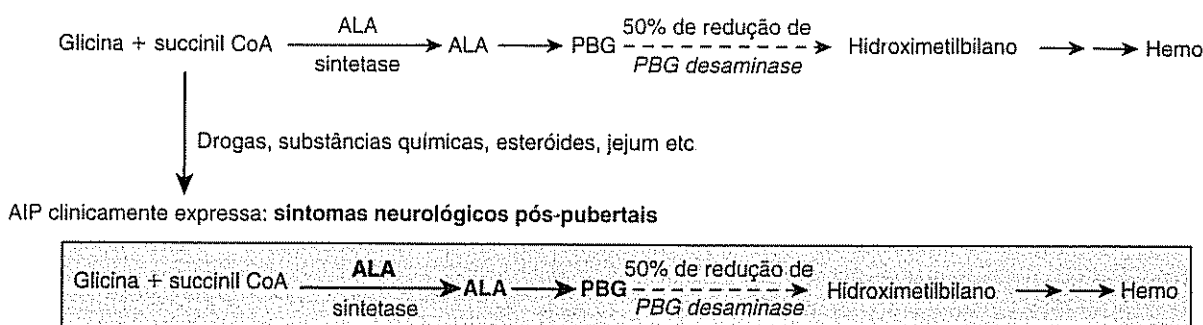



Fig. 12.34 A patogenia da porfiria intermitente aguda (AIP) Os pacientes com AIP que são clinicamente latentes ou afetados têm cerca de metade dos níveis dos controles de porfobilinogênio (PBG) desaminase Quando a atividade hepática da δ-ácido aminolevulínico (ALA) sintase está aumentada nos portadores por exposição a agentes indutores (p ex , drogas, substâncias químicas), a síntese de ALA e PBG é aumentada A atividade residual de PBG desaminase (aproximadamente 50% da dos controles) é sobrecarregada, e o acúmulo de ALA e PBG causa a doença clínica (Redesenhado de Kappas A , Sassa S., Galbraith R A , Nordmann Y (1989) The porphyrias *In* Scriver C R , Beaudet A L , Sly W S , Valle D (eds) The Metabolic Bases of Inherited Disease, 6 ª ed McGraw-Hill, New York, pp 1 305-1 365)

quanto traducionais. Assim, a deficiência relativa de hemo causada pela redução de PBG desaminase e a conseqüente diminuição nos reservatórios de hemo é responsável por um aumento *secundário* na sintase em níveis maiores que a faixa normal O fato de que metade da atividade normal de PBG desaminase é inadequada para lidar com a sobrecarga metabólica em algumas situações contribui tanto para a expressão dominante da condição quanto para a natureza episódica da doença clínica. A patogenia da doença do sistema nervoso é desconhecida. Tanto o sistema nervoso periférico quanto o autônomo e o central são afetados, e as manifestações clínicas são diversas. De fato, este distúrbio é um dos grandes mistérios na medicina clínica, com manifestações que variam desde dor abdominal aguda até psicose.

Deficiência de Glicose-6-fosfato Desidrogenase

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima ubíqua ligada ao X, é o defeito enzimático que produz doença mais comum dos humanos, e estima-se que afete 400 milhões de pessoas em todo o mundo; cerca de 10% dos homens afro-americanos são deficientes de G6PD e são clinicamente suscetíveis à hemólise induzida por drogas. Com mais de 400 variantes descritas, a deficiência de G6PD também parece ser um dos distúrbios genéticos mais heterogêneos já reconhecidos. Mais de 70 destas variantes foram caracterizadas no nível molecular. Todas, exceto duas, são mutações de ponto, sendo as exceções deleções da matriz de leitura de um pequeno número de códons. A alta freqüência gênica de variantes de G6PD em algumas populações parece refletir o fato de que a deficiência de G6PD, como a hemoglobina falciforme e a talassemia, conferem alguma proteção contra a malária (ver Cap. 7). Esta enzimopatia inicialmente chamou a atenção quando se viu que a droga antimalarígena primaquina induzia anemia hemolítica em alguns homens afro-americanos, que subseqüentemente se comprovou sofriam de deficiência de G6PD.

O mecanismo da hemólise induzida por drogas é razoavelmente claro. Um dos produtos da G6PD, a nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), é a principal fonte de equivalentes redutores nas hemácias. A NADPH protege a célula contra o dano oxidativo regenerando o glutatião reduzido de sua forma oxidada. Na deficiência de G6PD, as drogas oxidantes, tais como a primaquina, depletam a célula de glutatião reduzido, e o dano oxidativo conseqüente leva à hemólise. Os compostos agressores adicionais incluem os antibióticos sulfonamida, as sulfonas, tais como a dapsona (amplamente usada no tratamento da hanseníase e nas infecções por *Pneumocystis carinii*), a naftalina (antimofo) e algumas outras.

O favismo, uma grave anemia hemolítica que resulta da ingestão do feijão *Vicia faba* e que é conhecido há muito tempo em partes do mediterrâneo, deve-se à extrema deficiência de G6PD. O defeito enzimático torna as células vulneráveis aos oxidantes dos feijões de fava (Pitágoras, o matemático grego, alertou seus seguidores quanto ao perigo de comer estes feijões). Nas áreas em que as variantes da deficiência grave como o alelo mediterrâneo são prevalentes, elas são uma importante causa de icterícia neonatal e de anemia hemolítica não-esferocítica congênita.

Farmacogenômica

O Projeto do Genoma Humano levou ao reconhecimento de que a informação genômica pode ser aplicada de modo benéfico a problemas de farmacogenética em um novo campo de estudo chamado de **farmacogenômica**. Existem pelo menos dois aspectos deste excitante desenvolvimento. Primeiro, e de modo bem geral, é provável que a criação de novas drogas vá ser muito influenciada pelo conhecimento de todos os genes. Segundo, um perfil farmacogenético de cada indivíduo que é candidato a receber uma medicação pode ser desenvolvido, com dois benefícios possíveis. O primeiro benefício é que deverá ser possível prever, com um alto grau de precisão, as pessoas que provavelmente terão uma resposta adversa a uma medicação, mesmo sem o conhecimento específico do metabolismo da droga ou dos alelos específicos que modulam as respostas a ela. Assim, o desenvolvimento de um mapa de alta densidade de polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNP) (ver Cap. 6) do genoma humano poderia ser usado para desenvolver um perfil abreviado de SNP — um padrão específico de marcadores SNP — de pacientes que responderam adversamente a uma droga. Em concordância, os pacientes com perfis comparáveis, que, por-

tanto, estão em risco aumentado de uma resposta adversa, poderiam evitar medicações potencialmente perigosas. Além disso, as drogas que são muito benéficas e não-tóxicas para algumas pessoas — mesmo que a minoria de uma população — poderiam ser administradas com segurança a pacientes sem o perfil de risco SNP.

Um segundo benefício pode vir do desenvolvimento de perfis SNP farmacogenéticos abreviados: seria possível prever a eficácia provável da medicação em uma pessoa antes da droga ser administrada. Por exemplo, o perfil abreviado SNP farmacogenético de pacientes que metabolizam rapidamente a droga — e, portanto, precisam de doses mais altas — poderia ser determinado (mais uma vez, mesmo sem o conhecimento específico dos eventos bioquímicos envolvidos). Os pacientes com perfis SNP similares seriam, portanto, monitorados para que se tivesse convicção de que a droga atingiria níveis terapêuticos.

Embora os programas de triagem para perfis SNP farmacogenéticos abreviados já sugeridos possam ser dispendiosos, os custos podem ser mais que compensadores pela redução de respostas adversas a drogas e um tratamento mais efetivo. Além disso, o custo de *chips* de perfil de SNP abreviados provavelmente diminuirá se grandes quantidades de *chips* idênticos forem produzidas. Independente da precisão de qualquer destas previsões específicas, o projeto do genoma terá um grande impacto na criação e na administração de drogas, talvez de maneiras ainda não-imaginadas.

Farmacogenética na Medicina

Os exemplos anteriores demonstram a importância e o potencial da farmacogenética na medicina. Cada um representa um problema farmacogenético significativo no qual a terapia racional deve levar em conta as grandes diferenças individuais geneticamente determinadas na resposta. Em uma escala ampla, o papel do metabolismo de drogas em muitos processos fisiopatológicos, incluindo a mutagênese, a carcinogênese, a teratogênese, os danos citotóxicos e as doenças auto-imunes, é de grande importância. O tratamento de pacientes com reações tóxicas a drogas ou substâncias químicas deve incluir, quando possível, uma avaliação da condição farmacogenética do paciente e dos membros da família, bem como uma consulta genética apropriada sobre os riscos potenciais de algumas drogas. A aplicação dos conhecimentos do Projeto do Genoma Humano à farmacogenética deve levar a uma era de "medicina individualizada", na qual medicações apropriadas e terapias são criadas para cada paciente, considerando não apenas a apresentação e o curso da doença, mas também a constituição genética específica do indivíduo.

CONCLUSÃO

À medida que a patologia bioquímica de um número crescente de doenças genéticas for gradualmente esclarecida, e os componentes genéticos de doenças comuns multifatoriais forem caracterizados, novos e imprevisíveis mecanismos fisiopatológicos serão reconhecidos. A compreensão da doença genética em nível molecular não só contribui para o conhecimento da biologia humana normal, mas também é o alicerce para tratamentos efetivos destes distúrbios. Os princípios aplicados no tratamento da doença genética serão apresentados no Cap. 13, com exemplos que incluem muitas das condições que foram descritas aqui e no Cap. 11.

Referências Gerais

Cooper DN, Krawczak M (1993) Human Gene Mutation. Bios Scientific Publishers, Oxford, England.

Harris H (1980) The Principles of Human Biochemical Genetics, 3rd ed. Elsevier North-Holland, Amsterdam.

McKusick VA (1972) Heritable Disorders of Connective Tissue, 4th ed. CV Mosby, St Louis.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) (2001) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Scriver CR, Childs B (1989) Garrod's Inborn Factors and Disease. Oxford University Press, New York.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Byers PH (2001) Disorders of collagen biosynthesis and structure. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp 5241–5286.

Chillon M, Casals T, Mercier B, et al (1995) Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med 332:1475–1480

Chinnery PF, Turnbull DM (1999) Mitochondrial DNA and disease. Lancet 354:SI17–SI21.

Cox DW (2001) α_1-Antitrypsin deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp 5559–5586.

Davis L, Britten JJ, Morgan M (1997) Cholinesterase—its significance in anaesthetic practice. Anaesthesia 52:244–260.

Dubowitz V (1997) The muscular dystrophies—clarity or chaos? N Engl J Med 336:650–651

Glorieux FH, Bishop NJ, Plotkin H, et al (1998) Cyclic administration of pamidronate in children with severe osteogenesis imperfecta [see comments]. N Engl J Med 339:947–952.

Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS (2001) Familial hypercholesterolemia. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2863–2914.

Hackam AS, Wellington CL, Hayden MR (1998) The fatal attraction of polyglutamine-containing proteins. Clin Genet 53:233–242

Johns DR (1995) Mitochondrial DNA and disease. New Engl J Med 333:638–644.

Lautenschlager NT, Cupples LA, Rao VS, et al (1996) Risk of dementia among relatives of Alzheimer disease patients in the MIRAGE study: What is in store for the oldest old? Neurology 46:641.

Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N (1997) Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. Trends Genet 13:450–454.

Loke J, MacLennan DH (1998) Malignant hyperthermia and central core disease: Disorders of Ca^{2+} release channels. Am J Med 104:470–486.

Martin JB (1999) Molecular basis of the neurodegenerative disorders. New Engl J Med 340:1970–1980

Nance MA (1997) Clinical aspects of CAG repeat diseases. Brain Pathol 7:881–900. [This entire volume of the journal is devoted to CAG repeat diseases.]

Nebert DW (1999) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: Why is this relevant to the clinical geneticist? Clin Genet 56:247–258.

Nebert DW (1997) Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist? Am J Hum Genet 60:265–271

Roses AD (2000) Pharmacogenetics and future drug development and delivery. Lancet 355:1358–1361.

Scriver CR, Kaufman S (2001) The hyperphenylalaninemias: Phenylalanine hydroxylase deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp 1667–1724.

Scriver CR, Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: Lessons from phenylketonuria. Trends Genet 15:267–272.
Shoffner JM (1999) Oxidative phosphorylation disease diagnosis. Ann NY Acad Sci 893:42–60.
St George-Hyslop PH, Farrer LA, Goedert M (2001) Alzheimer's disease and the fronto-temporal dementias: Diseases with cerebral deposition of fibrillar proteins. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5875–5902.
Wallace DC, Lott MT, Brown MD, Kerstann K (2001) Mitochondria and neuro-ophthalmologic diseases. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 2425–2512.
Warren ST, Nelson DL (1994) Advances in molecular analysis of fragile X syndrome. JAMA 271:536–542.
Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic fibrosis. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5121–5188.
Worton R (2000) Muscular dystrophies: Diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. Science 270:755–756.
Worton RG, Molnan MJ, Brais B, Karpati G (2001) The muscular dystrophies. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 5493–5524.
Zielinski J (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. Respiration 67:117–133.
Zielinski J, Corey M, Rozmahel R, et al (1999) Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. Nat Genet 22:128–129.

URLs for Mutation Database

Collagem mutation database
http://www.le.ac.uk/genetics/collagem/
Cystic fibrosis and CFTR gene mutation database
http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/
Human mitochondrial genome disease database
http://www.gem.emmory.edu/mitomap.html
Phenylalanine hydroxylase mutation database
http://www.mcgill.ca/pahdb

Problemas

1. Um alelo mutante no locus receptor de LDL (que leva à hipercolesterolemia familiar) codifica uma proteína alongada que tem cerca de 50.000 dáltons a mais que o receptor normal, com 120.000 dáltons. Indique pelo menos três mecanismos que possam contribuir para esta anomalia. Aproximadamente quantos nucleotídeos extras precisariam ser traduzidos para adicionar 50.000 dáltons à proteína?

2. Ao discutir as mudanças de nucleotídeos encontradas na região codificante do gene CF, dissemos que algumas das mudanças (mudança de sentido) encontradas até agora são apenas mutações "hipotéticas" causadoras de doença. Que critérios se precisaria preencher antes de saber que uma mudança de nucleotídeo é patogênica e não um polimorfismo benigno?

3. Johnny, com 2 anos de idade, não está se desenvolvendo. As investigações mostram que, embora ele tenha os achados clínicos de CF, o cloreto de seu suor é normal. O cloreto do suor é normal em menos de 2% dos pacientes com CF. Seu pediatra e seus genitores querem saber se a análise de DNA pode determinar se ele de fato tem CF.
   (a) A análise de DNA seria usada neste caso? Resuma as etapas envolvidas na obtenção de um diagnóstico de DNA para CF.
   (b) Se ele tiver CF, qual a probabilidade de que seja homozigoto para a mutação $\Delta F508$? (Suponha que 85% das mutações CF possam ser detectadas na época em que você está sendo consultado e que os genitores da criança descendam no noroeste da Europa, onde o alelo $\Delta F508$ tem uma freqüência de 0,70).
   (c) Se ele não tiver a mutação $\Delta F508$, isto não comprova o diagnóstico? Explique.

4. James é a única pessoa na família a ser afetada pela DMD. Ele tem um irmão não-afetado, Joe. A análise de DNA mostra que James tem uma deleção no gene *DMD* e que Joe recebeu o mesmo cromossomo X materno, mas sem a deleção. Que consulta genética você daria aos genitores quanto ao risco de recorrência de DMD em uma futura gestação?

5. A *DMD* tem uma alta taxa de mutação, mas não mostra variação étnica na freqüência. Use seus conhecimentos sobre o gene e a genética da DMD para sugerir por que este distúrbio é igualmente comum em todas as populações.

6. Nos pacientes com osteogênese imperfeita, explique por que as mutações de mudança de sentido nas posições de glicina na hélice tripla do colágeno tipo I são confinadas a um número limitado de outros aminoácidos (Ala, Ser, Cis, Arg, Val, Asp).

7. A eletroforese dos hemolisados de hemácias mostra que algumas mulheres têm duas bandas de G6PD, mas que os homens têm apenas uma banda. Explique esta observação e o possível significado patológico e genético de achar duas bandas em uma mulher afro-americana.

8. Uma criança de 2 anos, filha de primos em primeiro grau, tem um inexplicado retardo de desenvolvimento. Um levantamento de vários parâmetros bioquímicos indica que a criança tem uma deficiência de quatro enzimas lisossômicas. Explique como uma única mutação autossômica recessiva pode causar a perda de função de quatro atividades enzimáticas. Por que é mais provável que a criança tenha uma condição autossômica recessiva, se tiver alguma condição genética?

9. O efeito de um alelo dominante negativo ilustra um mecanismo geral pelo qual as mutações em uma proteína causam uma doença herdada dominantemente. Que outro mecanismo é comumente associado à dominância em genes que codificam as subunidades de proteínas multiméricas?

10. Os efeitos clínicos das mutações em uma proteína de manutenção com freqüência são limitados a um ou a alguns tecidos, em geral tecidos nos quais a proteína é abundante e serve a uma função especial. Identifique e discuta exemplos que ilustrem esta generalização e explique por que eles são adequados.

11. A relação entre o local no qual uma proteína se expressa e o local da patologia de uma doença genética pode ser imprevisível. Além disso, o tecido com falta da proteína mutante pode até não ser afetado pela patologia. Cite exemplos deste último fenômeno e discuta-os.

12. Os dois alelos de pseudodeficiência de hex A são Arg 247 Trp e Arg 249 Trp. Qual o motivo provável para que as substituições de mudança de sentido destes alelos estejam tão próximas na proteína?

O Tratamento das Doenças Genéticas

Nas décadas vindouras, a biologia molecular, a engenharia de proteínas e o Projeto do Genoma Humano terão um impacto enorme no tratamento das doenças genéticas e outras. Neste capítulo, portanto, faremos uma revisão geral não só das terapias padrão usadas no tratamento das doenças genéticas, mas também delinearemos estratégias novas que poderão ser usadas no futuro. Em particular, destacaremos terapias que refletem o enfoque genético da medicina. Como em todas as terapias, o objetivo do tratamento das doenças genéticas é eliminar ou melhorar os efeitos do distúrbio não só no paciente, mas também na família. Além disso, a família deve ser informada sobre o risco de que a doença possa vir a ocorrer em outros membros. Esta última responsabilidade, a consulta genética, um componente importante no tratamento dos distúrbios hereditários, será tratada em separado no Cap. 19. O tratamento preferido de algumas, e talvez de muitas, doenças monogênicas eventualmente será a terapia de transferência gênica, se o procedimento puder ser seguro e efetivo. Já foram obtidos sucessos iniciais promissores com a terapia gênica. Entretanto, mesmo quando cópias de um gene normal podem ser transferidas para o paciente para efetuar uma cura permanente, em muitos casos a família precisará de uma consulta genética continuada, de teste de portador e de diagnóstico pré-natal durante várias gerações. Para distúrbios monogênicos, o tratamento geralmente se baseia na reposição da proteína deficiente, melhorando seu funcionamento ou minimizando as conseqüências de sua deficiência.

SITUAÇÃO ATUAL DO TRATAMENTO DAS DOENÇAS GENÉTICAS

Doenças Multifatoriais

Para a maioria das doenças multifatoriais (ver Cap. 15), tanto os componentes ambientais quanto os genéticos da etiologia são pouco compreendidos. Quando uma contribuição ambiental é reconhecida, há uma oportunidade efetiva de intervenção, pois a exposição ao fator ambiental em geral pode ser modificada. Assim, o fumo de cigarros é um fator ambiental que todos os pacientes com enfisema devem evitar. Pelo menos um mecanismo pelo qual o fumo de cigarros leva ao enfisema foi revelado pelo estudo do distúrbio monogênico da deficiência de α_1-antitripsina (α_1-AT). Como foi descrito no capítulo anterior, o fumo de cigarros oxida a metionina crítica no sítio ativo de α_1-AT, o que reduz em 2.000 vezes sua capacidade de inibir a elastase. Assim, o fumo produz uma perda adquirida substancial da função de α_1-AT.

A maioria das doenças com herança complexa é passível de alguma forma de tratamento cirúrgico ou médico, embora este tratamento possa não ser particularmente "genético" em seu enfoque. Um exemplo marcante de um distúrbio geneticamente complexo para o qual a terapia médica padrão é cada vez mais bem-sucedida é a diabetes melito tipo 1, na qual uma intensa terapia de reposição de insulina melhora acentuadamente o resultado (Quadro 13.1). O tratamento cirúrgico de distúrbios multifatoriais também pode ser bem-sucedido. Por exemplo, três anomalias estruturais (defeitos cardíacos congênitos, fenda labial e palatina e estenose pilórica) afetam cerca de 1,5% de todas as crianças nativivas e constituem aproximadamente 30% de todos os neonatos com doenças genéticas. Muitos pacientes com estas condições podem ser *curados* por cirurgia, uma forma de modificação fenotípica. Em cerca de metade destes pacientes as doenças são curáveis por uma única operação. Portanto, a cura é possível em pelo menos 10% a 15% das crianças com um distúrbio geneticamente determinado. O tratamento das doenças hereditárias em geral não é tão benéfico, embora com freqüência melhore a qualidade de vida. Para os distúrbios multifatoriais que se manifestam tipicamente na adolescência ou na vida adulta, tais como a hipertensão essencial, a diabetes, a doença arterial coronariana e as principais psicoses, as imperfeições do tratamento refletem nossa ignorância quanto à etiologia ou à complexidade da patogenia.

Doenças Monogênicas

O tratamento das doenças monogênicas infelizmente ainda é muito deficiente. Um levantamento de 372 distúrbios mendelianos mostrou que a terapia atual é totalmente efetiva em 12%, parcialmente efetiva em 54% e sem benefícios em 34% (Fig. 13.1). Uma tendência identificada em vários levantamentos é que o tratamento tem mais probabilidade de ser bem-sucedido se o defeito bioquímico básico for conhecido. Por exemplo, em um estudo realizado por Hayes e colaboradores em 1985, verificou-se que era possível aumentar o tempo de vida por meio de tratamento em apenas 15% das doenças monogênicas estudadas, mas em um subgrupo de 65 erros hereditários nos quais a causa era conhecida, esta porcentagem subiu para 32%. Aumentos simila-

QUADRO 13-1

O Efeito de Intensa Terapia de Reposição de Insulina nas Taxas de Três Complicações Comuns da Diabetes Melito Tipo 1

	Taxa/100 pacientes		
	Tratamento Convencional	*Tratamento Intensivo*	*% de Redução de Risco*
Retinopatia	4,7	1,2	76
Albuminúria	3,4	2,2	34
Neuropatia	9,8	3,1	69

De Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N Engl J Med 329:977-986. Adaptado de Scriver C. R., Treacy E. P. (1999) Is there treatment for "genetic" disease? Mol Gen Metab 68:93-102

res foram observados para outros fenótipos, incluindo crescimento, inteligência e adaptação social. Assim, as pesquisas para elucidar a base genética e bioquímica das doenças hereditárias têm um impacto drástico no paciente. Entretanto, em geral a terapia atual não restaura a saúde normal à grande maioria dos pacientes com um distúrbio monogênico.

O atual estado insatisfatório do tratamento das doenças genéticas deve-se a vários fatores, incluindo os que se seguem:

1. **Gene não-identificado ou patogenia incompreendida.** O locus mutante em mais de 75% das doenças genéticas é desconhecido, e o conhecimento da fisiopatologia destas doenças nas quais o gene afetado ou a anomalia bioquímica foi definida é inadequado. Na fenilcetonúria (PKU), por exemplo, a despeito de anos de estudo, os mecanismos pelos quais a elevação da fenilalanina prejudica o desenvolvimento e o funcionamento cerebral ainda são pouco compreendidos (ver Cap. 12). Para as doenças nas quais o funcionamento da proteína afetada só foi determinado recentemente, tais como a fibrose cística e a distrofia muscular Duchenne (DMD) (ver Cap. 12), muito trabalho ainda é necessário antes que este conhecimento básico possa ser traduzido em terapia efetiva.
2. **Dano fetal pré-diagnóstico.** Algumas mutações atuam cedo no desenvolvimento ou causam uma patologia irreversível antes que sejam diagnosticadas. Estes problemas podem ser antecipados em alguns casos, se houver uma história familiar de uma doença genética ou se a triagem do portador identificar casais em risco. No último caso, o tratamento pré-natal às vezes é possível para condições médicas e cirúrgicas. As oportunidades de tratamento pré-natal, cujos exemplos são mostrados no Quadro 13.2, aumentarão à medida que o diagnóstico pré-natal (ver Cap. 18) tornar-se viável para uma gama cada vez maior de distúrbios.
3. **Os fenótipos graves são os primeiros a ser reconhecidos.** Os casos iniciais de uma doença a ser reconhecida em geral são aqueles afetados de modo mais grave, que normalmente são menos passíveis de tratamento do que aqueles afetados de maneira mais branda. Nos casos brandos, a proteína mutante pode reter alguma função residual que pode ser aumentada por várias estratégias, como será descrito mais adiante.

CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS NO TRATAMENTO DAS DOENÇAS GENÉTICAS

A Necessidade de Uma Avaliação a Longo Prazo do Tratamento

Nas doenças genéticas, talvez mais que em outras áreas da medicina, o tratamento que de início se julga bem-sucedido pode,

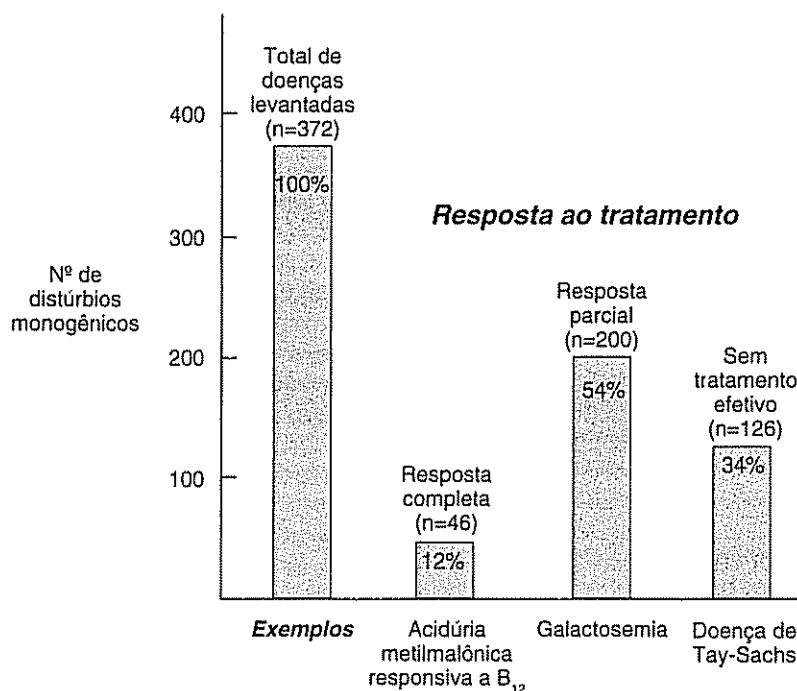



Fig. 13.1 O efeito do tratamento em 372 doenças genéticas nas quais o gene afetado ou a função bioquímica é conhecido e para as quais estão disponíveis informações suficientes para análise. A acidúria metilmalônica responsiva a B_{12} e a doença de Tay-Sachs são discutidas no Cap. 12, e a galactosemia é descrita neste capítulo. (Adaptado de Scriver C. R., Treacy E. P. [1999] Is there treatment for "genetic" disease? Mol Gen Metab 68:93-102.)

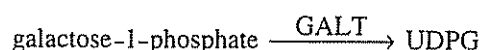
QUADRO 13-2

Exemplos de Tratamento Pré-natal de Distúrbios Herdados e Congênitos

Tratamento Médico Pré-natal		**Tratamento Cirúrgico Pré-natal**	
Doença	*Tratamento*	*Doença*	*Tratamento*
Deficiência de biotinidase	Administração materna de biotina	Obstrução urinária devida a valvas uretrais → hidronefrose	Cateter percutâneo ou vesicostomia
Acidúria metilmalônica cobalamina-responsiva	Administração materna de cobalamina	Hérnia diafragmática → hipoplasia do pulmão	Reduzir víscera e reparar diafragma
Hiperplasia adrenal congênita	Dexametasona	Síndrome de transfusão gêmeo-gêmeo → seqüestro vascular → hidropisia fetal	Separar vasos comunicantes placentários

eventualmente, demonstrar-se imperfeito. Existem pelo menos três facetas neste problema. Primeiro, o tratamento pode inicialmente parecer bem-sucedido e após uma longa observação apresentar pequenas inadequações. Assim, embora crianças com PKU bem-tratadas tenham escapado de um retardo grave e tenham um QI normal ou quase normal (ver adiante), elas em geral manifestam sutis distúrbios de aprendizagem e de comportamento que prejudicam seu desempenho acadêmico.

Segundo, ao tratamento bem-sucedido de mudanças patológicas em um órgão podem se seguir problemas inesperados em tecidos que antes não se havia observado que estavam clinicamente envolvidos porque os pacientes não haviam sobrevivido tempo suficiente para isto. A detecção das últimas manifestações pode exigir muitos anos de observação após a terapia inicial. Um distúrbio que ilustra este ponto é um erro hereditário do metabolismo de carboidratos bem conhecido, a **galactosemia**. Este distúrbio resulta da incapacidade de metabolizar a galactose, um monossacarídeo que é componente da lactose (açúcar do leite). As pessoas com esta doença autossômica recessiva não têm a enzima galactose-1-fosfato uridil transferase (GALT), que normalmente catalisa a conversão de galactose-1-fosfato em uridina difosfogalactose (UDPG):

$$\text{galactose-1-phosphate} \xrightarrow{\text{GALT}} \text{UDPG}$$

As crianças com galactosemia em geral são normais ao nascimento, mas começam a desenvolver problemas gastrintestinais, cirrose hepática e cataratas semanas após o início do aleitamento. Se não for reconhecida, a galactosemia causa grave retardo mental e em geral é fatal. A remoção total de leite da dieta, entretanto, pode proteger contra a maioria das conseqüências prejudiciais da deficiência de GALT, embora, como acontece com a PKU, hoje se saiba que os problemas de aprendizagem são comuns mesmo nos pacientes galactosêmicos bem-tratados. Além disso, a despeito de um tratamento bem-feito, a maioria das mulheres com galactosemia tem insuficiência ovariana que parece resultar da toxidez continuada de galactose.

Outra doença que demonstra este fenômeno é a **cistinose**, que é causada pelo acúmulo de cistina no lisossomo em decorrência de um defeito no efluxo de cistina (ver Quadro 12.1). O armazenamento de cistina inicialmente leva à insuficiência renal. À medida que os pacientes que recebem transplantes renais envelhecem, entretanto, a morbidade resulta de hipotireoidismo, da doença das ilhotas que causa diabetes e de várias anomalias neurológicas. Um exemplo final é dado por mutações no gene de retinoblastoma (ver Cap. 16). Os pacientes submetidos à tratamento bem-sucedido para o tumor ocular nos primeiros anos de vida correm um risco aumentado de desenvolver uma malignidade independente, o osteossarcoma, após a primeira década. Ironicamente, portanto, o tratamento que de modo bem-sucedido prolonga a vida também cria uma nova oportunidade para a expressão clínica do defeito básico, em particular em condições nas quais o gene mutante é normalmente expresso em muitos tecidos, fornecendo, assim, mais alvos potenciais para o desenvolvimento de patologia.

Terceiro, a terapia que é tida como livre de efeitos colaterais a curto prazo pode estar associada a graves problemas a longo prazo. Por exemplo, a infusão do fator de coagulação na hemofilia às vezes resulta na formação de anticorpos contra a proteína infundida, e a transfusão de sangue na talassemia invariavelmente produz sobrecarga de ferro, que pode ser tratada, mas com dificuldade.

Heterogeneidade Genética e Tratamento

O tratamento ideal para os defeitos monogênicos requer um grau incomum de precisão diagnóstica, em geral no nível da molécula afetada. Como foi descrito nos capítulos iniciais, a heterogeneidade genética (heterogeneidade alélica ou heterogeneidade de locus) é uma característica comum das doenças genéticas. Para um tratamento apropriado, em geral é crucial não só tratar uma anomalia bioquímica, mas também identificar precisamente o defeito bioquímico básico, em oposição a um defeito secundário (ver o Quadro 11.1). Por exemplo, as anomalias na fenilalanina hidroxilase e nas enzimas do metabolismo de biopterina produzem hiperfenilalaninemia, mas o tratamento dos dois tipos de defeitos é bem diferente. Mesmo as mutações alélicas podem exigir tratamentos diferentes: os distúrbios clinicamente distintos de β-globina, talassemia e anemia falciforme ilustram este conceito.

O estudo das variantes alélicas dos defeitos enzimáticos mostrou que os alelos que conservam pequenas quantidades de atividade enzimática residual em geral causam doenças bem menos graves que os alelos nulos. O contraste entre a necessidade de uma estrita restrição dietética de fenilalanina em pacientes com PKU clássica (com pouca ou nenhuma atividade enzimática residual) e a dieta normal tolerada por aqueles com hiperfenilalaninemia benigna (com cerca de 5% de atividade enzimática residual) ilustra este princípio. O corolário desta observação é que o tratamento efetivo da PKU clássica por transferência de enzi-

ma ou gene exigiria a produção ou a liberação de apenas pequenas quantidades de fenilalanina hidroxilase.

A heterogeneidade alélica tem implicações adicionais para a terapia. Alguns alelos produzem uma proteína que é diminuída em abundância, mas que tem função residual. As estratégias criadas para aumentar a expressão ou a estabilidade da proteína parcialmente funcional podem ser efetivas na correção do defeito bioquímico. Em contraste, não se ganha nada aumentando a quantidade de uma proteína mutante sem função residual. Na verdade, o aumento de expressão de uma proteína mutante sem função pode ser prejudicial, pois ela pode exercer um efeito dominante negativo (ver Cap. 12) se interagir com o produto do alelo normal, ou com outras proteínas, para impedir seu funcionamento. Esta consideração também é relevante para os esforços em transferir um gene normal para um paciente com uma doença genética. Por exemplo, no que diz respeito aos pacientes com osteogênese imperfeita, pode ser mais fácil tratar daqueles com alelos nulos por transferência gênica do que daqueles com cadeias de colágeno qualitativamente anormais que reduzem a contribuição efetiva do gene transferido (ver Fig. 12.21).

ESTRATÉGIAS DE TRATAMENTO

As doenças genéticas podem ser tratadas em muitos níveis, em várias etapas distantes do gene mutante (Fig. 13.2). No restante deste capítulo, descreveremos a lógica usada ou proposta para o tratamento em cada um destes níveis. Em geral, as doenças já descritas neste livro são usadas como exemplos, embora outros distúrbios sejam apresentados pela primeira vez, quando necessário, para ilustrar um enfoque específico. Nenhum dos atuais tratamentos é necessariamente mutuamente exclusivo, embora uma terapia gênica bem-sucedida torne outras terapias supérfluas. Para as doenças nas quais se conhece o defeito bioquímico ou genético, a freqüência com a qual as diferentes estratégias são usadas atualmente é mostrada na Fig. 13.3.

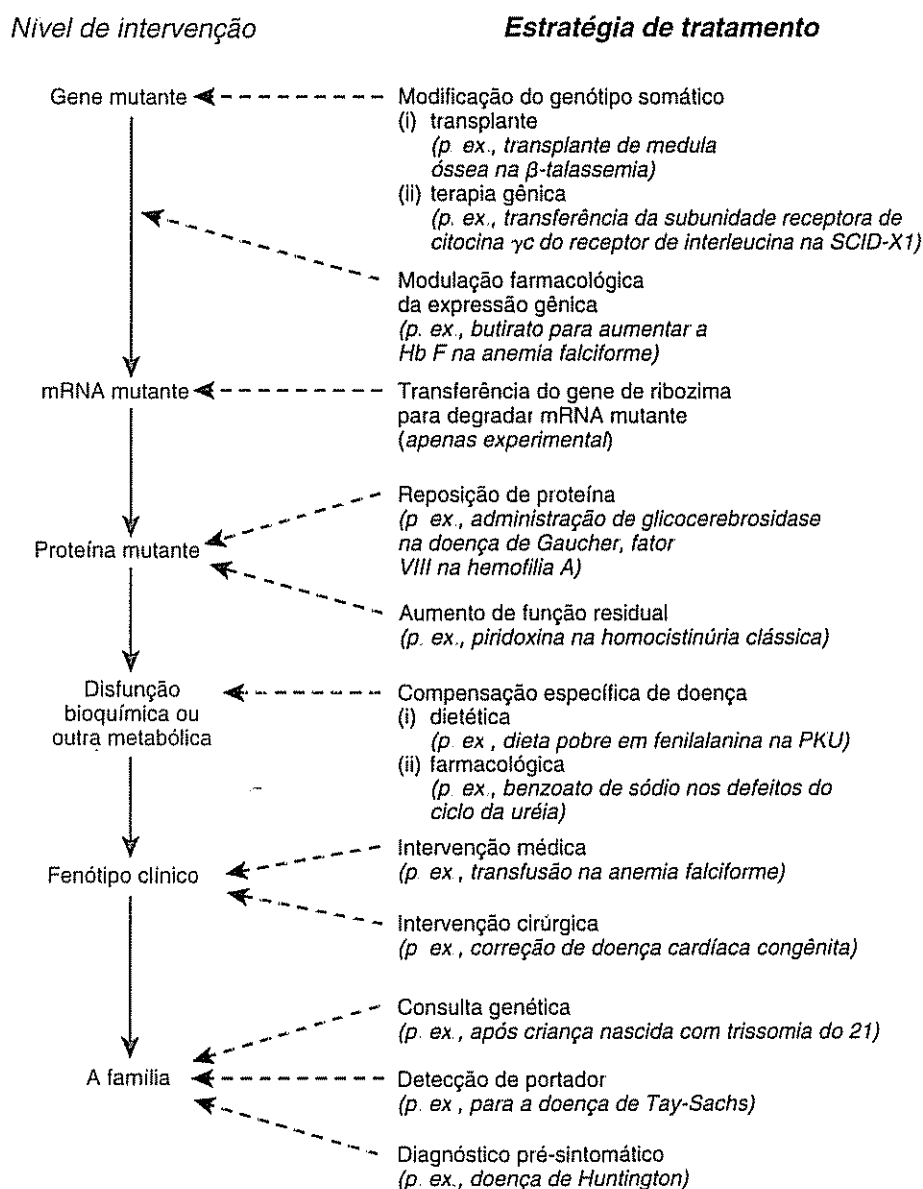



Fig. 13.2 Os vários níveis de tratamento que são relevantes para as doenças genéticas, com as correspondentes estratégias usadas em cada nível. Para cada nível, uma doença discutida no texto é dada como um exemplo. (Adaptada de Valle D. [1987] Genetic disease: An overview of current therapy. Hosp Pract 22:167-182.)

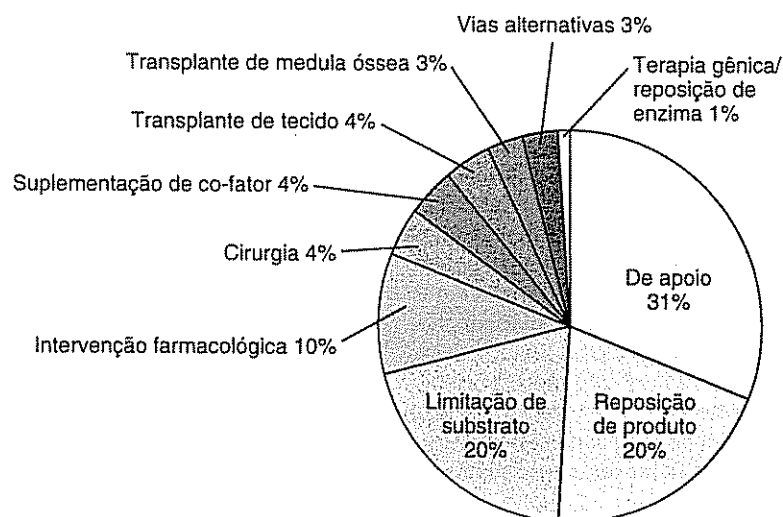



Fig. 13.3 A freqüência com a qual várias estratégias terapêuticas e de tratamento são atualmente usadas para 372 distúrbios metabólicos (o mesmo grupo de distúrbios mencionados na Fig 13 1) Se um distúrbio é tratado usando-se. por exemplo. duas estratégias. o impacto de cada estratégia no tratamento total foi estimado e alocado entre cada enfoque (De Scriver C R . Treacy E P |1999| Is there treatment for "genetic" disease? Mol Gene Metab 68:93-102)

O tratamento "ao nível do fenótipo clínico" (ver Fig. 13.2) é uma categoria destinada a incluir todos os tipos de intervenção médica ou cirúrgica que não são únicas para o tratamento das doenças genéticas Em geral, esta é a única terapia disponível e, em alguns casos, pode ser tudo o que é necessário, como descrevemos antes para algumas malformações cirurgicamente corrigíveis. Finalmente, a importância de educar o paciente não pode ser menosprezada — não só para alcançar a compreensão da doença, suas implicações gerais e seu tratamento, mas também para garantir sua cooperação com a terapia, que pode ser inconveniente e por toda a vida.

Tratamento das Doenças Metabólicas

O enfoque mais bem-sucedido para a abordagem do tratamento das doenças genéticas específicas tem sido no nível de uma anomalia metabólica. De fato, este conceito é bem familiar, porque se aplica a todos os *Homo sapiens*: os humanos e outros primatas, em contraste com a maioria dos mamíferos, compensam sua incapacidade de produzir ácido ascórbico (vitamina C) incluindo esta vitamina essencial em sua dieta. As principais estratégias usadas para manipular o metabolismo no tratamento de erros inatos são mostradas no Quadro 13.3. A necessidade que têm os pacientes com doenças farmacogenéticas, tais como a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, de evitar algumas drogas e substâncias químicas foi descrita no Cap. 12.

Restrição Dietética

A restrição dietética é um dos métodos mais antigos e mais efetivos de tratamento das doenças genéticas. Doenças que envol-

QUADRO 13-3

Tratamento de Doenças Genéticas por Manipulação Metabólica

Tipo de Intervenção Metabólica	Substância ou Técnica	Doença
Evitar	Drogas antimalarígenas Barbituratos	Deficiência de G6PD Porfiria intermitente aguda
Restrição dietética	Fenilalanina Galactose	PKU Galactosemia
Reposição	Tiroxina Biotina	Hipotireoidismo congênito Deficiência de biotinidase
Desvio	Benzoato de sódio Resinas orais	Distúrbios do ciclo da uréia Heterozigotos para hipercolesterolemia familiar
Inibição	Lovastatina	Heterozigotos para hipercolesterolemia familiar
Depleção	Aferese de LDL (remoção direta de LDL do plasma)	Homozigotos para hipercolesterolemia familiar

G6PD = glicose-6-fosfato desidrogenase; LDL = lipoproteína de baixa densidade; PKU = fenilcetonúria
Modificado de Rosenberg L. E (1990) Treating genetic diseases: Lessons from three children Pediatr Res 27:S10-S16

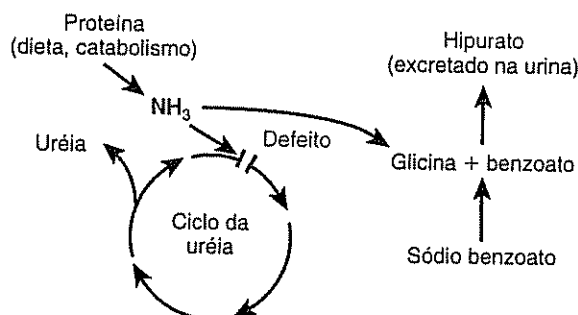



Fig. 13.4 A estratégia de desvio metabólico Neste exemplo, a amônia não pode ser removida pelo ciclo da uréia devido a um defeito genético de uma enzima do ciclo da uréia. A administração de sódio benzoato desvia a amônia para a síntese de glicina, e a fração de nitrogênio é subseqüentemente excretada como hipurato

vem mais de 24 loci são tratadas deste modo hoje em dia. A vantagem deste enfoque é que ele pode ser altamente efetivo. Seu aspecto negativo é que em geral requer cooperação durante toda a vida para que seja mantida uma dieta restrita e normalmente artificial. As restrições dietéticas são caras para a família bem como para o paciente, especialmente na adolescência. Muitas das doenças tratáveis deste modo envolvem vias catabólicas de aminoácidos e, portanto, uma grande restrição da proteína dietética normal em geral é necessária. Nutrientes essenciais, tais como aminoácidos, entretanto, não podem ser totalmente abolidos. Sua ingestão deve ser suficiente para as necessidades anabólicas. Para este grupo de pacientes que têm defeitos enzimáticos brandos (alelos mutantes "vazantes" [*leaky*]), uma pequena fração do composto agressor em geral pode ser tolerada. Conseqüentemente, a dieta é menos restritiva e a adesão pode ser melhor. Se o precursor dietético da substância agressora não for um nutriente essencial, ele também pode ser eliminado da dieta. Um exemplo de tal composto é a galactose, que o corpo pode produzir a partir da glicose em quantidades adequadas para as pequenas necessidades dos processos bioquímicos normais, tais como a síntese de mucopolissacarídeos.

Uma dieta restrita em fenilalanina evita bem o dano neurológico na PKU clássica (ver Cap. 12). As crianças fenilcetonúricas são normais ao nascimento porque a enzima materna as protege durante a vida pré-natal. Os resultados do tratamento são melhores quando o diagnóstico é feito logo após o nascimento e o tratamento começa imediatamente. Se a criança é alimentada com uma dieta normal no primeiro mês de vida, ocorre um retardo mental irreversível. O grau de déficit intelectual está diretamente relacionado à demora na instituição de uma dieta pobre em fenilalanina. A condição mental normal dos pacientes com hiperfenilalaninemia benigna demonstra que o tratamento efetivo da PKU clássica pode ser obtido mantendo-se os níveis de fenilalanina abaixo de cerca de 0,4 mM. Sem esta orientação, seriam necessárias muitas tentativas para se estabelecer um nível "seguro" de fenilalanina plasmática na doença clássica. Hoje recomenda-se que os pacientes com PKU mantenham uma dieta pobre em fenilalanina por toda a vida, pois anomalias neurológicas e comportamentais desenvolvem-se em muitos (embora não em todos) pacientes quando a dieta é interrompida. Mesmo nos pacientes que foram tratados durante toda a vida, entretanto, hoje está claro que quando a inteligência (medida em QI) é normal, ou quase normal, ainda existem déficits neuropsicológicos (em habilidades conceituais, visuoespaciais e de linguagem). Entretanto, deve-se destacar que os procedimentos de tratamento produzem resultados muito superiores aos obtidos sem o tratamento.

Reposição

O fornecimento de metabólitos essenciais, co-fatores ou hormônios cuja deficiência deve-se a uma doença genética é simples em termos conceituais e, em geral, em termos de aplicação. Alguns dos defeitos monogênicos tratados de forma mais bem-sucedida pertencem a esta categoria. Um exemplo importante é dado pelo **hipotireoidismo congênito**. De 10% a 15% dele é de origem monogênica. Este distúrbio resulta de uma variedade de defeitos na formação da glândula tireóide ou de seu principal produto, a tiroxina. Como o hipotireoidismo congênito é comum (cerca de 1/4.000 neonatos) e o tratamento pode evitar o retardo mental associado, a triagem neonatal é feita em

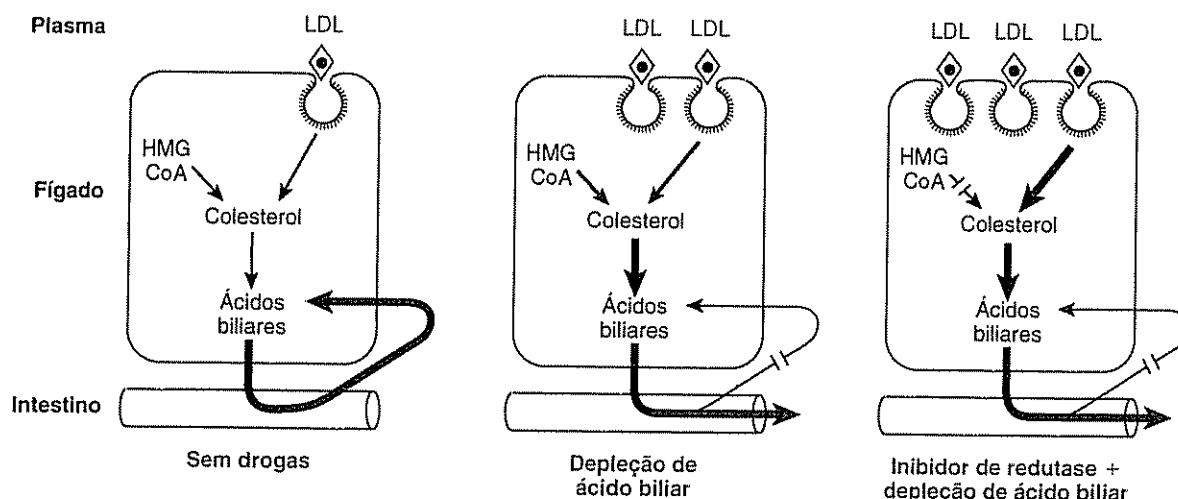



Fig. 13.5 Fundamento para o uso combinado de uma resina ligadora de ácidos biliares e um inibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase no tratamento dos heterozigotos para hipercolesterolemia familiar (De Brown M S, Goldstein J L (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis Science 232:4 Copyright da Nobel Foundation)

muitos países, de modo que a administração de tiroxina pode ser iniciada tão logo seja possível após o nascimento, a fim de evitar os graves defeitos intelectuais que de outro modo são inevitáveis. Um segundo exemplo é dado pela **deficiência de biotinidase**. A falta de atividade de biotinidase impede a recuperação de biotina das proteínas biotiniladas e, como resultado, a reciclagem deste co-fator enzimático é perturbada. A administração oral de grandes quantidades de biotina é totalmente corretiva, se for aplicada antes que se desenvolvam as graves seqüelas neurológicas.

Desvios

A terapia de desvios é o uso acentuado de vias metabólicas alternativas para reduzir a concentração de um metabólito prejudicial. A estratégia de desvio tem sido aplicada de modo bem-sucedido no tratamento de **distúrbios do ciclo da uréia** (Fig. 13.4). A função do ciclo da uréia é converter a amônia, que é neurotóxica, em uréia, que é um produto final benigno que é excretado. Se o ciclo for perturbado por um defeito enzimático, tal como a deficiência de argininosucinato ou liase, a hiperamonemia conseqüente só pode ser parcialmente controlada pela restrição dietética da proteína. A amônia pode ser reduzida a níveis normais pelo desvio para vias metabólicas que normalmente são de significado secundário, levando à síntese de compostos não-prejudiciais. Por exemplo, a administração de grandes quantidades de benzoato de sódio força sua ligação com glicina a formar hipurato, que é excretado na urina (ver Fig. 13.4). A síntese de glicina é assim aumentada, e para cada mol de glicina formada, um mol de amônia é consumido.

Um enfoque similar tem sido bem-sucedido no que diz respeito a ajudar a reduzir o nível de colesterol nos *heterozigotos* para **hipercolesterolemia familiar (FH)** (revista no Cap. 12). Pelo desvio de uma fração aumentada de colesterol para síntese de bile, o único gene normal de receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) destes pacientes pode ser estimulado a produzir mais receptores hepáticos de LDL-colesterol (Fig. 13.5). O tratamento atinge uma redução significativa no colesterol do plasma porque 70% de toda a captação mediada pelo receptor de LDL de colesterol é pelo fígado. O aumento de síntese de ácidos biliares é obtido pela administração oral de resinas não-absorvíveis, tais como a colestiramina e colestipol, que ligam ácidos biliares no intestino e aumentam sua excreção fecal.

Um princípio importante ilustrado neste exemplo é que as doenças autossômicas dominantes às vezes podem ser tratadas aumentando-se a expressão do alelo normal. Esta estratégia em geral é inefetiva nos pacientes sem o alelo normal, incluindo, por exemplo, os *homozigotos* para FH. Entretanto, os pacientes que são homozigotos para uma doença genética podem ter alguma resposta aos tratamentos usados para os heterozigotos (Fig. 13.5), se ainda houver alguma atividade residual de um dos dois alelos mutantes.

Inibição

A inibição farmacológica das enzimas às vezes é usada para modificar as anomalias metabólicas dos erros hereditários. Este princípio também é explorado de modo efetivo no tratamento de pacientes com FH. Se forem usados métodos para diminuir a carga de colesterol desviando-o para outros compostos ou removendo-o com métodos físicos, como será descrito na seção que se segue, o fígado tentará compensar a deficiência de colesterol aumentando sua síntese. Em conseqüência, o tratamento dos heterozigotos FH é mais efetivo se a síntese de colesterol hepático for simultaneamente inibida. O desenvolvimento das estatinas — poderosos inibidores competitivos da enzima limitadora da taxa de síntese de colesterol, 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase — permitiu um enfoque combinado racional que é altamene efetivo. As altas doses de estatina efetuam uma redução de 40% a 60% nos níveis de LDL-colesterol do plasma nos heterozigotos FH. Quando usada junto com a colestiramina (Fig. 13.5), o efeito é sinérgico, e diminuições maiores podem ser obtidas. A segurança a longo prazo das estatinas provou ser marcantemente boa. Como a maioria dos homo zigotos FH tem pouca ou nenhuma atividade residual de receptor de LDL, as estatinas em geral são inefetivas no tratamento destes pacientes.

Depleção

As doenças genéticas caracterizadas pelo acúmulo de um composto prejudicial às vezes são tratadas pela remoção direta do

QUADRO 13–4

Tratamento de Doenças Genéticas no Nível da Proteína Mutante

Estratégia	Exemplo	Condição
Aumento da função da proteína mutante		
Administração de co-fator para aumentar a atividade enzimática	Homocistinúria responsiva à piridoxina	Tratamento de escolha em 50% dos pacientes que respondem
Reposição de proteína		
Reposição de uma proteína extracelular	Fator VIII na hemofilia A	Bem estabelecida, efetiva
	α_1-antitripsina na deficiência de α_1-antitripsina	Infusão intravenosa (IV) para aumentar os níveis sérico/pulmonar. Bioquímica e clinicamente benéfica em muitos pacientes. A terapia com aerossol pode suplantar a infusão IV
Reposição extracelular de proteína intracelular	Adenosina desaminase (PEG-ADA) modificada por polietileno glicol na deficiência de ADA	Bem estabelecida, segura e efetiva, mas cara
Reposição de proteínas intracelulares: direcionamento celular	Glicocerebrosidase modificada na doença de Gaucher	Estabelecida, efetiva bioquímica e clinicamente, cara

composto do corpo. Este princípio também é ilustrado pela FH. Os homozigotos FH respondem bem à remoção de LDL do plasma por um método chamado de aferese de LDL. Uma vez por semana, o plasma do paciente é passado continuamente, durante 2 a 3 horas, por colunas que removem a apolipoproteína B que contém lipoproteínas, incluindo LDL. São obtidas reduções de até 70% de LDL colesterol.

Tratamento no Nível da Proteína

Se uma proteína mutante tem alguma função residual, pode ser possível aumentar esta atividade aumentando-se a estabilidade da proteína ou a capacidade residual de função de cada molécula anormal. Nas enzimopatias, a melhoria obtida no funcionamento por este enfoque em geral é muito pequena, da ordem de alguns poucos por cento, mas normalmente este aumento é tudo do que se precisa para restaurar a homeostasia bioquímica. Logicamente, as mutações que impedem a síntese de qualquer proteína funcional não são sujeitas a este enfoque. Além disso, a maioria das proteínas não interage com ligandos "corretivos" que podem ser dados em grandes quantidades e, nestes casos, o tratamento em nível proteico pode ser obtido apenas com a substituição da própria proteína.

Melhoria do Funcionamento da Proteína Mutante

As anomalias bioquímicas de várias doenças metabólicas podem responder, às vezes intensamente, à administração de grandes quantidades do co-fator vitamínico da enzima prejudicada pela mutação (Quadro 13.4). Na verdade, os **erros hereditários responsivos à vitamina** estão entre as doenças genéticas tratadas de forma mais bem-sucedida. As vitaminas usadas são marcantemente atóxicas, o que em geral permite a administração segura de quantidades 100 a 500 vezes maiores que as necessárias para a nutrição normal. Os mecanismos que contribuem para o efeito terapêutico variam com a doença. Na deficiência de biotinidase, por exemplo, a resposta ocorre porque a biotina administrada substitui a biotina que não é removida e reciclada devido à deficiência de biotinidase, a partir das enzimas às quais é ligada. Na **homocistinúria** decorrente de deficiência de cistationina sintase (ver Fig. 12.7), o mecanismo difere, pois o co-fator, o piridoxal fosfato, não é covalentemente ligado à apoenzima. Cerca de 50% destes pacientes respondem à administração de altas doses de piridoxina (vitamina B_6, o precursor de piridoxal fosfato). Na maioria destes pacientes, a homocistina desaparece do plasma. O aumento na atividade da enzima hepática é de apenas algumas vezes: em um caso, por exemplo, de 1,5% para apenas 4,5% da atividade controle. As concentrações aumentadas de piridoxal fosfato podem superar a afinidade reduzida da enzima mutante pelo co-fator (Fig. 13.6). A enzima mutante também pode ser estabilizada por sua associação com o co-fator. Em qualquer caso, o tratamento com piridoxina melhora substancialmente o curso clínico da doença nos pacientes que respondem. Nos pacientes não-responsivos em geral não há atividade residual de cistationina sintase a aumentar.

Reposição de Proteína

Os principais tipos de reposição de proteínas usados hoje em dia estão resumidos no Quadro 13.4. A reposição de proteínas é parte do repertório terapêutico *rotineiro* em apenas algumas doenças, todas as quais afetam proteínas cujo principal sítio de ação é o plasma ou líquido extracelular. A prevenção ou o fim de episódios de sangramento nos pacientes com hemofilia pela infusão de frações do plasma enriquecidas do fator VIII é o exemplo princi-

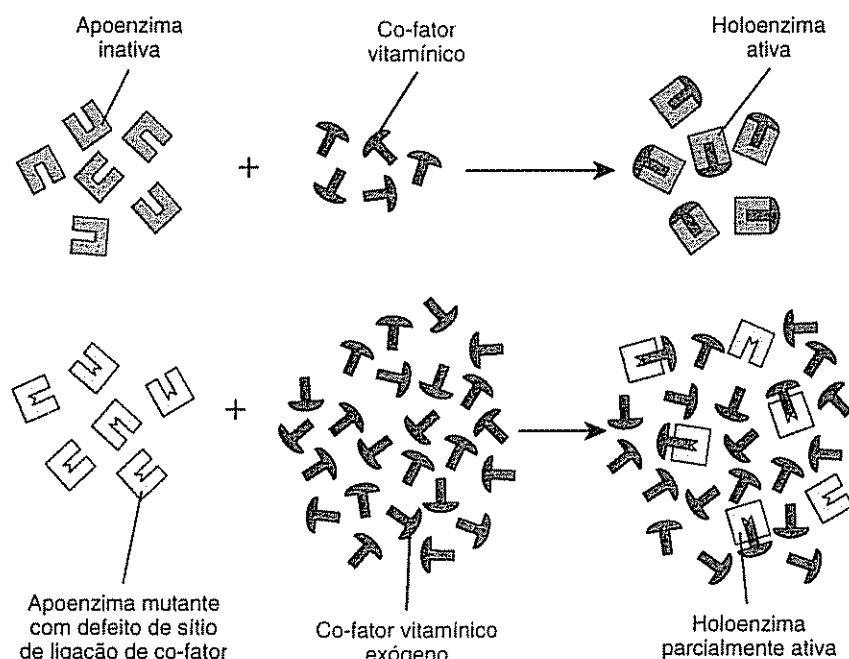



Fig. 13.6 O mecanismo de resposta de uma apoenzima mutante à administração de seu co-fator em altas doses. Os defeitos enzimáticos responsivos à vitamina em geral são devidos a mutações que reduzem a afinidade normal (*em cima*) da enzima (apoenzima) pelo co-fator necessário para ativá-la. Na presença de altas concentrações do co-fator que resultam da administração de até 500 vezes a necessidade diária normal, a enzima mutante adquire uma pequena quantidade de atividade suficiente para restaurar a normalidade bioquímica. (Redesenhado de Valle D. (1987) Genetic disease: An overview of current therapy. Hosp Pract 22:167-182.)

pal. Os anos de experiência com esta doença também indicam os problemas que podem ser antecipados à medida que novas estratégias, descritas mais adiante, estimulam as tentativas de reposição de outros polipeptídeos, particularmente intracelulares. Os problemas incluem a dificuldade e o custo para procurar quantidades suficientes de proteína para tratar todos os pacientes com uma freqüência ideal, a necessidade de administrar a proteína com uma freqüência compatível com sua meia-vida (apenas 8 a 10 horas para o fator VIII), a formação de anticorpos neutralizantes em alguns pacientes (5% dos hemofílicos clássicos) e a contaminação da proteína com agentes exógenos, particularmente vírus (hepatite, vírus da imunodeficiência humana).

Reposição de Uma Proteína Extracelular: Deficiência de Alfa$_1$-Antitripsina

A α_1-AT, descrita no Cap. 12, é o principal inibidor de elastase do neutrófilo, uma enzima proteolítica destrutiva estocada nos neutrófilos. Existem cerca de 40.000 homozigotos Z Z apenas nos EUA. Assim, a deficiência de α_1-AT é uma causa significativa de morte prematura na população de adultos (ver Fig. 12.9). O tratamento mais efetivo da deficiência de α_1-AT é uma modificação ambiental — evitar o fumo. O objetivo da terapia adicional é restabelecer o equilíbrio entre a elastase e a α_1-AT pelo direcionamento da α_1-AT ao epitélio pulmonar e líquido intersticial alveolar. Nos pacientes com deficiência de α_1-AT, a α_1-AT pode ser infundida por via intravenosa em doses grandes o suficiente para manter a concentração intersticial de α_1-AT em um nível inibidor efetivo por 1 semana ou mesmo por mais tempo. Um efeito clínico significativo é observado apenas nos pacientes com prejuízo moderado (entre 30% e 65% do normal) da função pulmonar antes do tratamento. Isto é, nos pacientes com uma redução maior ou menor de funcionamento pulmonar antes do tratamento, não se observa uma diminuição significativa da perda da função pulmonar. Um enfoque ainda mais promissor é oferecido pela administração de α_1-AT diretamente nos pulmões por inalação de aerossol. Este tratamento requer apenas 10% da dose intravenosa de α_1-AT e atinge níveis efetivos tanto no pulmão quanto no plasma com inalações realizadas duas vezes ao dia.

Reposição Extracelular de Uma Enzima Intracelular: Deficiência de Adenosina Desaminase

A adenosina desaminase (ADA) é uma enzima crucial do metabolismo de purinas que catalisa a desaminação da adenosina em inosina e da desoxiadenosina em desoxiinosina (Fig. 13.7).

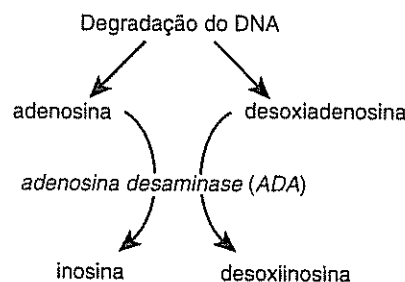



Fig. 13.7 A adenosina desaminase (ADA) converte a adenosina em inosina e a desoxiadenosina em desoxiinosina. Na deficiência de ADA, o acúmulo de desoxiadenosina nos linfócitos é linfotóxico, matando as células por prejudicar a replicação do DNA e a divisão celular para causar uma imunodeficiência combinada grave (SCID).

Os efeitos patológicos da deficiência de ADA, uma doença autossômica recessiva, resultam inteiramente de anomalias nos linfócitos, nos quais a enzima é normalmente encontrada em seus níveis mais altos. A linfotoxidez resultante causa uma profunda insuficiência de imunidade tanto mediada por célula (célula T) quanto humoral (célula B), tornando a deficiência de ADA uma das causas da imunodeficiência combinada severa (SCID) (ver Cap. 14). Os pacientes que não são tratados morrem de infecção dentro dos primeiros 2 anos de vida. O transplante de medula óssea de um doador totalmente compatível quanto à HLA é o tratamento atual de escolha. Na ausência de um doador apropriado, um tratamento muito efetivo é a administração de ADA bovina que tenha sido modificada para aumentar sua eficácia.

Adenosina Desaminase Modificada. Numerosos estudos estabeleceram que a infusão de hemácias normais em pacientes com deficiência de ADA reduz os níveis de metabólitos tóxicos, particularmente de desoxiadenosina. Entretanto, a resposta era variável e pouco mantida. Para evitar estes problemas, a ADA bovina é modificada pela ligação covalente de um polímero inerte, o polietileno glicol (PEG). A ADA modificada por PEG tem pouca imunogenicidade, não entra nas células e tem uma meia-vida de 3 a 6 dias no plasma (em comparação com 30 minutos no camundongo normal). A terapia de reposição PEG-ADA (injeção intramuscular uma ou duas vezes por semana) quase normaliza as anomalias metabólicas no metabolismo de purina. Embora PEG-ADA não corrija completamente o funcionamento imune (muitos pacientes continuam T linfopênicos), a imunoproteção é restaurada e ocorre uma acentuada melhora clínica. Este enfoque, embora muito caro, representa uma importante estratégia nova para o tratamento de uma doença genética.

Os princípios gerais exemplificados pelo uso de PEG-ADA são (1) que as proteínas podem ser modificadas para melhorar sua efetividade como reagentes farmacológicos, sem interferir necessariamente em sua atividade biológica e (2) que uma enzima que normalmente é situada dentro da célula pode ser efetiva extracelularmente se seu substrato estiver em equilíbrio com o líquido extracelular e se seu produto puder ser captado pelas células que o necessitam. Como será ilustrado na próxima seção, a estratégia de modificação pode ser estendida a proteínas que podem funcionar apenas intracelularmente, direcionando a proteína para um tipo celular específico.

Reposição de Proteínas Intracelulares: Enzimas Direcionadas

A possibilidade de direcionar um polipeptído para uma célula específica e um determinado compartimento intracelular já foi demonstrada para a **doença de Gaucher**, o mais prevalente distúrbio de armazenamento lisossômico, que afeta até 1/450 judeus Ashkenazi e 1/40.000 a 1/100.000 indivíduos de outras populações. Esta condição autossômica recessiva deve-se a uma deficiência da enzima glicocerebrosidase. Seu substrato, glicocerebrosídeo, é um lipídio complexo normalmente degradado no lisossomo. Esta patologia resulta do acúmulo de glicocerebrosídeo, em particular nos lisossomos de macrófagos no sistema reticuloendotelial. O processo de armazenamento do macrófago leva a um grande aumento do fígado e do baço. Além disso, a medula óssea é lentamente substituída por macrófagos cheios de lipídeos ("células de Gaucher"), que no final comprometem a produção de eritrócitos e plaquetas, causando ane-

mia e trombocitopenia. As lesões da medula óssea causam dor episódica, osteonecrose e grande morbidade. Uma minoria de pacientes tem uma degeneração progressiva do sistema nervoso central.

A reposição de glicocerebrosidase na doença de Gaucher ilustra o desafio de direcionar uma proteína tanto para um tipo particular de célula quanto para um endereço intracelular específico, neste caso o macrófago e o lisossomo, respectivamente. A doença de Gaucher é um modelo propício ao direcionamento de proteína por vários motivos. Primeiro, como na maioria das proteínas o sistema nervoso central não está envolvido, a enzima deve ser direcionada apenas para o sistema reticuloendotelial periférico. Segundo, a única terapia alternativa no momento é o transplante de medula óssea, um procedimento relativamente de alto risco. Terceiro, a enzima humana está disponível em abundância, purificada ou da placenta ou de uma forma recombinante secretada por células cultivadas. Finalmente, a biologia do macrófago é bem compreendida o bastante para se sugerir uma estratégia de direcionamento da enzima para ele.

Mais de 2.500 pacientes estão sendo tratados hoje em todo o mundo com glicocerebrosidase, com intensos benefícios clínicos. O aumento do nível de hemoglobina de um paciente, uma resposta representativa vista na maioria dos pacientes, é mostrado na Fig. 13.8. Além de tudo, esta terapia também reduz o aumento do fígado e do baço, aumenta a contagem de plaquetas, acelera o crescimento e melhora as anomalias esqueléticas características. Este sucesso depende de uma modificação dos carboidratos que normalmente se associam a esta glicoproteína: os açúcares terminais são removidos para expor o cerne das unidades α-manosil. As manoses expostas direcionam a enzima para o macrófago, via um receptor de manose na membrana plasmática. Uma vez ligada, a enzima é internalizada e dirigida ao lisossomo. Como na terapia de PEG-ADA, a reposição de glicocerebrosidase atualmente é muito cara. Entretanto, esta estratégia demonstra um princípio importante e ilustra a possibilidade de direcionar uma enzima intracelular para seu local fisiologicamente relevante, a fim de produzir efeitos clinicamente significativos. Para muitas doenças, deve ser possível usar o gene clonado para produzir grandes quantidades da proteína relevante em cultura e modificar o polipeptídeo do modo necessário para o direcionamento celular e intracelular específico.

Fig. 13.8 O efeito de infusões intravenosas semanais de glicocerebrosidase modificada na concentração de hemoglobina de uma criança com doença de Gaucher sem envolvimento neurológico. O tratamento foi iniciado aos 4 anos de idade e continuou por 18 meses. A terapia foi acompanhada de um aumento na contagem de plaquetas e melhora radiológica nas anomalias ósseas. Os parâmetros hematológicos retornaram aos níveis anteriores ao tratamento quando as infusões pararam. A barra na abscissa representa o período de administração da enzima. (Redesenhado de Barton N. W., Furbish F. S., Murray G. J., *et al.* [1990] Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. Proc Natl Acad Sci USA 87:1913-1916.)

Modulação da Expressão Gênica

Como demonstraram os erros hereditários do metabolismo responsivos a vitaminas, mesmo pequenos aumentos no funcionamento de uma proteína mutante podem ser vantajosos se ela tiver um funcionamento residual. Efeitos terapêuticos também podem ser obtidos, pelo menos em princípio, extraindo-se pequenos aumentos na quantidade de RNA mensageiro transcrito pelo locus afetado (Quadro 13.5), desde que a proteína mutante retenha alguma função residual. No momento, não existe nenhum exemplo no qual se possa demonstrar um efeito terapêutico benéfico que tenha surgido em decorrência deste mecanismo. Uma estratégia alternativa, em estudo para a anemia falciforme, é aumentar a expressão de um gene normal que compense o efeito da mutação em outro locus. Este exemplo ilustra um conceito que provavelmente é aplicável a uma variedade de condições.

Terapia de Butirato na Anemia Falciforme. A anemia falciforme causa doença tanto pela anemia quanto pelo afoiçamento das hemácias (ver Cap. 11). Duas observações sugeriram que a indução de um aumento no nível de hemoglobina (Hb) F ($\alpha_2\gamma_2$) beneficiaria os pacientes com este distúrbio. Primeiro, a HbF é um transportador de oxigênio perfeitamente adequado na via pós-natal, embora sua abundância nas hemácias adultas dos humanos normais seja baixa (< 1% da hemoglobina total). Segundo, a polimerização de desoxiemoglobina S é inibida pela HbF, e demonstrou-se que os altos níveis de HbF (a níveis de mais de 20 g/100 ml) nos pacientes com anemia falciforme de algumas partes da Índia e da Arábia Saudita melhoram a gravidade clínica da doença. (A base genética de seu aumento de expressão do gene γ, uma forma de persistência hereditária de hemoglobina fetal [ver Cap. 11], é desconhecida.)

O reconhecimento de que o butirato pode aumentar a expressão do gene de γ-globina surgiu da observação de que nas crianças com mães diabéticas as altas concentrações de plasma de ácido α-amino-n-butírico estão associadas a uma demora na mudança pós-natal do gene γ para β (ver Fig. 11.4). Subseqüentemente, vários estudos de pacientes com anemia falciforme mostraram que a administração de butirato de fato aumenta a expressão do gene de γ-globina por um mecanismo desconhecido (Fig. 13.9). Um trabalho posterior é necessário para estabelecer os benefícios a longo prazo deste tratamento e identificar os efeitos colaterais. No mínimo estas observações demonstram que, na clínica, é possível aumentar a expressão pós-natal de genes para um grau terapeuticamente significativo.

Modificação do Genoma Somático por Transplante

As células transplantadas conservam o genótipo do doador e, conseqüentemente, o transplante pode ser visto como uma for-

QUADRO 13-5

Tratamento por Modificação do Genoma ou sua Expressão

Tipo de Modificação	Exemplo	Situação
Modulação farmacológica da expressão gênica	Terapia de butirato para estimular a síntese de γ-globina (e, portanto, da HbF) na anemia falciforme e na β-talassemia	Em pesquisa
Modificação parcial do genótipo somático		
Por transplante	Transplante de medula óssea na β-talassemia	Curativo com doador compatível em HLA; em geral, bons resultados
	Transplante de medula óssea nas doenças de armazenamento, p. ex., a síndrome de Hurler	Excelentes resultados em algumas doenças, mesmo se o cérebro for afetado, como na síndrome de Hurler
	Transplante de fígado na deficiência de α_1-antitripsina	Até 80% de sobrevida em 5 anos para doença genética do fígado
Por transferência gênica em tecidos somáticos	Hemofilia B	Em pesquisa: uma tentativa inicial em 3 pacientes usando injeção intramuscular de doses baixas de um vírus adeno-associado expressando fator IX levou a pequenas mudanças nas metas clínicas

ma de terapia de transferência gênica porque leva a uma modificação do genoma somático. Como o genoma do receptor permanece inalterado em todas as outras células, o receptor torna-se, de fato, um mosaico. Existem duas indicações gerais para o uso de transplante no tratamento de uma doença genética. Primeiro, as células ou órgãos podem ser transplantados *para introduzir cópias tipo selvagem de um gene* em um paciente com mutações neste gene. Esta indicação tem a irônica conseqüência de fazer com que um órgão aparentemente normal às vezes seja removido porque sua disfunção bioquímica está danificando outro tecido. Este é caso, por exemplo, da homozigose para FH, na qual o transplante de fígado é um procedimento efetivo, mas de alto risco. À medida que cresça a experiência com o transplante parcial (p. ex., de células hepáticas para um local ectópico), entretanto, e a terapia gênica seja bem-sucedida, os transplantes de

Fig. 13.9 O efeito da administração de pulsos de butirato na porcentagem de hemoglobina (HbF) em 11 pacientes com anemia falciforme. Cada barra gráfica mostra os níveis iniciais de HbF e o aumento em HbF durante a terapia nos 11 pacientes. Cada paciente recebeu a droga por 4 dias (o "pulso"), seguida de 10 a 24 dias sem ela. Os níveis de HbF aumentaram de uma média de 7.2% para uma média de 21% de butirato. (Adaptado de Atweh G F, Sutton M, Nassif I, *et al* [1999] Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. Blood 93:1790-1797.)

órgãos inteiros para esta finalidade se tornarão menos freqüentes. A segunda e mais comum indicação para o transplante é a de *reposição celular*, para compensar um órgão danificado por uma doença genética (p. ex., um fígado que se torna cirrótico na deficiência de α_1-AT). Alguns exemplos de usos de transplante na doença genética são dados no Quadro 13.5.

Transplante de Medula Óssea em Doenças de Não-armazenamento

Além do amplo uso no tratamento de câncer, o transplante de medula óssea também é o tratamento de escolha para um grupo seleto de distúrbios de deficiência imune, incluindo a SCID de qualquer tipo. Salvo algumas outras condições sem nenhuma outra terapia efetiva, seu papel no tratamento das doenças genéticas em geral é menos certo e realizado sob cuidadosa avaliação. Por exemplo, o tratamento convencional de pacientes com talassemia por meio de transfusões freqüentes e quelação de ferro tem dado excelentes resultados em alguns centros. Por outro lado, ótimos resultados também têm sido obtidos com transplante de medula óssea no tratamento de pacientes com β-talassemia com menos de 16 anos. Mais de 90% dos pacientes com função hepática normal e uma história de boa quelação têm sobrevida de 3 anos livres de efeitos prejudiciais. Antes de tomar qualquer decisão sobre o melhor modo de tratamento (padrão *versus* transplante de medula óssea), deve-se fazer uma avaliação a longo prazo dos pacientes que eram relativamente saudáveis antes do início do tratamento e então foram tratados com um ou outro enfoque. O papel do transplante de medula óssea nos pacientes com alguma doença de armazenamento lisossômico será discutido mais adiante.

Transplante de Células-tronco Hematopoéticas de Sangue da Placenta. As células-tronco são células que se auto-renovam definidas por duas propriedades: (1) elas podem se proliferar para produzir tipos celulares diferenciados de um tecido *in vivo* e, uma vez desenvolvidas, (2) podem continuar a se auto-renovar durante a vida do organismo. As células-tronco embrionárias, que podem originar o organismo inteiro, serão discutidas no Cap. 17. No momento, a única célula-tronco de relevância clínica é a célula-

tronco hematopoética, que pode reconstituir o sistema sanguíneo após o transplante de medula óssea. Embora a medula óssea há muito seja a principal fonte de células-tronco hematopoéticas transplantáveis e de células genitoras, a descoberta de que o sangue placentário (que está prontamente disponível) representa uma fonte rica de células-tronco hematopoéticas está começando a causar um impacto substancial no tratamento da malignidade e da doença genética.

O uso de sangue placentário tem três grandes vantagens sobre a medula óssea como uma fonte de células-tronco hematopoéticas. Primeiro, os receptores são mais tolerantes ao sangue placentário histoincompatível que às outras células alogênicas doadoras. Assim, o enxerto pega mesmo se até três antígenos de HLA não forem compatíveis entre o doador e o receptor. Segundo, a grande disponibilidade de sangue placentário, juntamente com o aumento de tolerância das células doadoras histoincompatíveis, amplia muito o número de potenciais doadores para qualquer receptor. Esta última característica é de particular significado para os pacientes de grupos étnicos minoritários, para os quais o grupo de potenciais doadores é relativamente pequeno. Terceiro, o risco de doença enxerto-*versus*-receptor é substancialmente reduzido usando-se células do sangue placentário como fonte doadora. É provável que o isolamento e a caracterização das células-tronco de outros tecidos, incluindo o sistema nervoso, eventualmente possibilite a reposição celular em uma ampla variedade de malignidades e doenças genéticas.

Transplante de Medula Óssea em Doenças de Armazenamento Lisossômico

Mecanismo de Efeito. No final da década de 1980, começou a emergir um quadro cautelosamente encorajador a partir dos estudos animais e humanos de transplantes de medula óssea nas doenças de armazenamento lisossômico. Agindo por meio dos dois mecanismos mostrados na Fig. 13.10, os transplantes de medula óssea são efetivos em corrigir o armazenamento lisossômico em muitos tecidos, incluindo, em alguma doenças, o cérebro. Primeiro, as células transplantadas são uma fonte de enzimas lisossômicas que podem ser transferidas para outras células pelo líquido extracelular, como foi inicialmente mostrado pelos experimentos de co-cultivo de Neufeld e colaboradores com células das síndromes de Hurler e Hunter (ver Cap. 12). Como as células derivadas da medula óssea constituem cerca de 10% do total da massa celular do corpo, o impacto quantitativo das enzimas transferidas delas pode ser significativo. Segundo, o sistema mononuclear-fagócito na maioria dos tecidos, se não em todos, é derivado de células-tronco da medula óssea e, assim, após o transplante de medula óssea, este sistema é de origem do doador em todo o corpo. De especial destaque são as células microgliais perivasculares do cérebro, cuja origem da medula pode responder em parte pela correção das anomalias do sistema nervoso por transplante de medula óssea em alguns distúrbios de armazenamento.

Hoje está bem estabelecido que o transplante de medula óssea corrige ou reduz as anomalias viscerais de muitas doenças de armazenamento. Por exemplo, como se poderia prever pela eficácia da terapia enzimática (já descrita), os pacientes com doença de Gaucher são curados pela transferência de enzimas conferidas pelas células da medula óssea do doador, com correções do retardo de crescimento, da dor óssea e da esplenomegalia. Uma normalização ou redução comparável no tamanho do fígado, do baço, e do coração também é obtida na síndrome de Hurler (ver Cap. 12), e melhorias na obstrução das vias aéreas superiores, na mobilidade das articulações e na opacidade da córnea também são alcançadas. As anomalias esqueléticas da síndrome de Hurler em geral

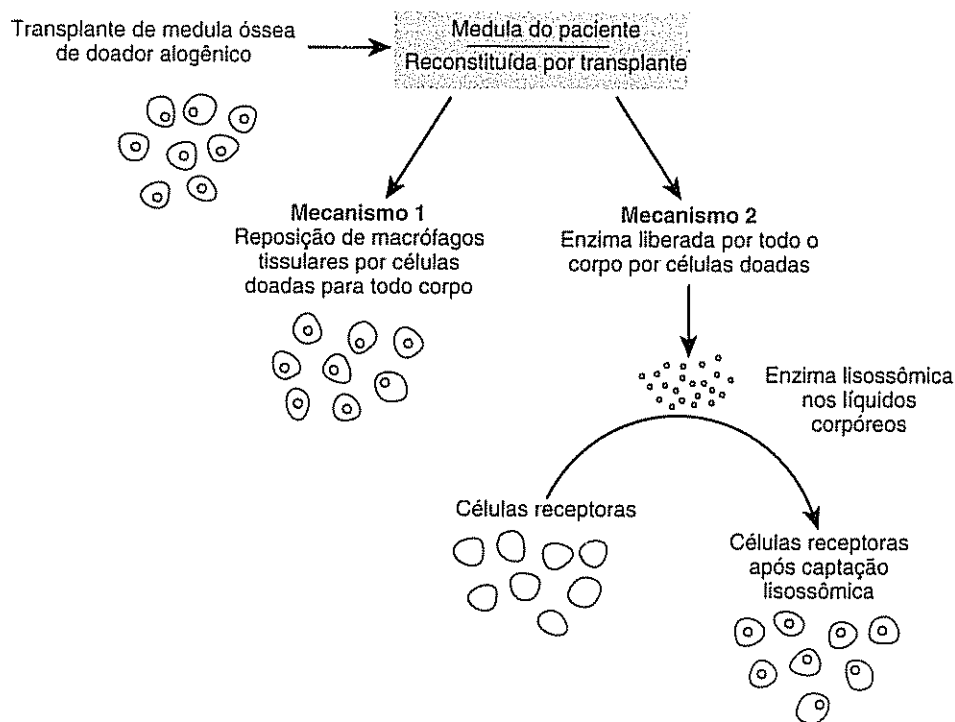



Fig. 13.10 Os dois principais mecanismos pelos quais o transplante de medula óssea ou a transferência gênica para a medula óssea podem reduzir o acúmulo de substrato nas doenças de armazenamento lisossômico. A medula óssea transfectada expande-se para repopular o sistema monócito-macrófago do paciente. Além disso, as enzimas lisossômicas são liberadas pelas células da medula óssea derivadas do doador e captadas pelas células deficientes da enzima do líquido extracelular.

não são corrigidas pelo transplante de medula óssea, entretanto, e esta ausência de efeito sobre as doenças esqueléticas também ocorre com outras doenças de armazenamento.

O resultado mais recompensador após o transplante de medula em pacientes com doença de Hurler é o efeito deste tratamento no cérebro. Os pacientes com síndrome de Hurler que têm bons índices de desenvolvimento antes do transplante e que se submetem ao transplante antes dos 24 meses de idade continuam a se desenvolver cognitivamente após o transplante, em contraste com a perda inexorável da função intelectual que ocorreria de outro modo. Curiosamente, um efeito de dosagem gênica é manifesto na medula doada: as crianças que recebem células de doadores normais homozigotos parecem ter mais probabilidade de reter uma inteligência totalmente normal que os receptores de células doadoras heterólogas.

Um efeito ainda mais acentuado no componente neurológico de uma doença de armazenamento tem sido observado após o transplante de medula óssea de pacientes com a forma de manifestação tardia de leucodistrofia de célula globóide (ou doença de Krabbe), um distúrbio degenerativo da substância branca. Os pacientes com a forma de manifestação tardia desta doença, que se deve a uma deficiência da enzima galactocerebrosidase, têm um início clínico entre 0,5 e 3 anos de idade. O distúrbio caracteriza-se por uma degeneração progressiva da mielina periférica e central, espasticidade, demência e neuropatia periférica. Os pacientes que sofreram transplantes não só tiveram uma parada do processo da doença como também uma melhora ou normalização dos tremores, da ataxia, da descoordenação motora e de outras anomalias. Além disso, os defeitos estruturais da substância branca no cérebro destes pacientes em geral são reversíveis (Fig. 13.11). O sucesso dos transplantes de medula óssea no tratamento de alguns distúrbios de armazenamento indicam a eficácia da terapia de transferência gênica em muitas destas condições. Neste caso, o gene de interesse será transferido para as células do paciente cultivadas, precedendo o transplante de medula.

Transplante de Fígado

Para algumas doenças hepáticas metabólicas, o transplante de fígado é o tratamento de escolha, porque é o único tratamento benéfico conhecido. Por exemplo, a doença hepática crônica associada à fibrose cística e à deficiência de α_1-AT só pode ser tratada com transplante hepático, e juntos estes dois distúrbios são responsáveis por uma grande fração de todos os transplantes de fígado feitos na população pediátrica. O transplante de fígado tem sido feito para duas dúzias de doenças genéticas. No momento, a taxa de sobrevida de 5 anos para todas as crianças que receberam transplante de fígado está na faixa de 70% a 85%. Para quase todos estes pacientes, a qualidade de vida em geral é muito melhorada, a anomalia específica que determinou o transplante é corrigida (como nos homozigotos para FH) e, nas condições nas quais ocorreu o dano hepático (tais como a deficiência de α_1-AT), o fornecimento de um tecido hepático saudável restaura o crescimento e o desenvolvimento puberal normal.

Os Problemas e o Futuro dos Transplantes

Existem dois grandes problemas que limitam o uso mais amplo dos transplantes. Primeiro, a mortalidade após o transplante é significativa e a morbidade por infecções decorrentes da necessidade de imunossupressão e da doença hospedeiro-*versus*-enxerto são substanciais. A meta final das pesquisas relativas aos transplantes — transplantes sem imunossupressão — está cada vez mais próxima, e se isto for alcançado a condição terapêutica atual de mui-

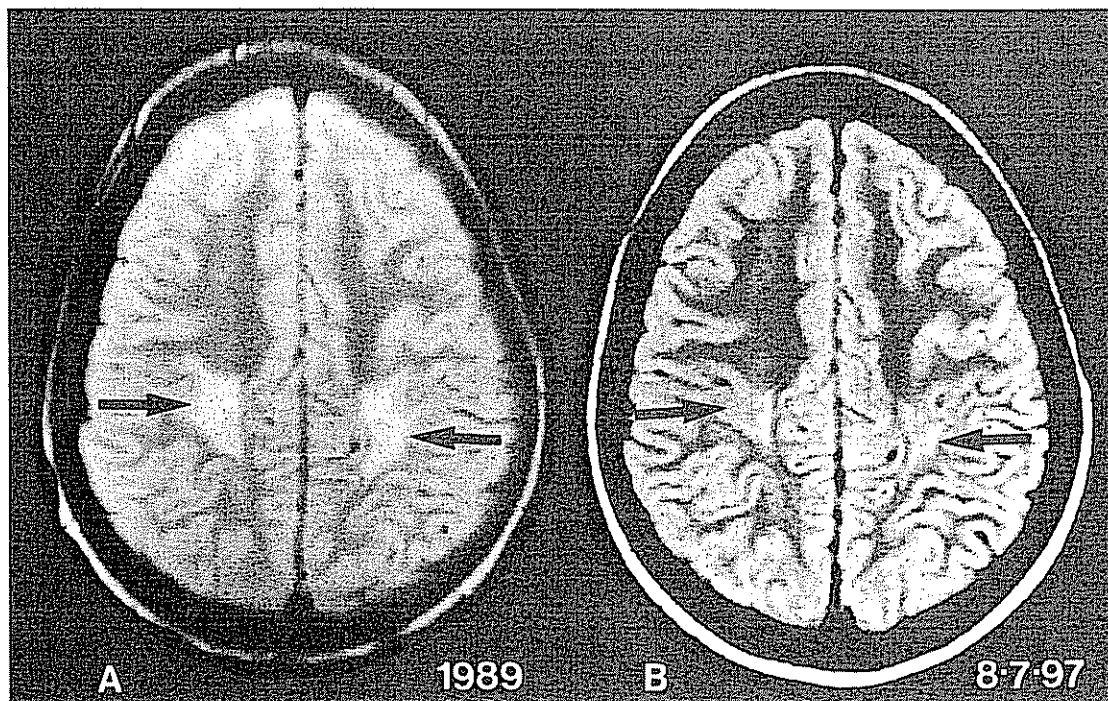



Fig. 13.11 O efeito do transplante de medula óssea nas anomalias da substância branca em um paciente com a forma de manifestação tardia da leucodistrofia de célula globóide. Oito anos após o transplante o aumento do sinal de substância branca visto antes do tratamento está bem reduzido. (De Krivit W *et al* [1998] Hematopoietic stem-cell transplantation in globoid cell leukodystrophy. N Eng J Med 338:1119-1126. copyright © 1998 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

tas doenças, tanto genéticas quanto adquiridas, será transformada. A tolerância aumentada do receptor às células-tronco do sangue do cordão umbilical do doador (comparada com as células doadas derivadas de medula óssea) exemplifica os avanços nesta área. Além da necessidade de imunossupressão, um segundo problema é o suprimento finito de órgãos Por exemplo, para todas as indicações, entre 4.000 e 5.000 transplantes de fígado podem ser necessários anualmente apenas nos EUA. Além disso, ainda permanece por ser demonstrado que os órgãos transplantados em geral são capazes de funcionar normalmente durante toda a vida.

Uma solução que evitaria muitos dos problemas associados aos transplantes isogênicos envolve a combinação de terapia com células-tronco e a gênica. Nesta situação, as próprias células-tronco do paciente seriam cultivadas *in vitro*, transfectadas por terapia gênica com o gene de interesse e retornadas ao paciente para repopular o tecido afetado com células geneticamente restauradas. A identificação das células-tronco em uma variedade de tecidos humanos adultos e os recentes avanços na terapia de transferência gênica são muito promissores a este respeito.

Terapia Gênica

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou considerar a correção das doenças genéticas no nível mais fundamental, o gene. A terapia gênica é a introdução de um gene em uma célula com o fim de obter um efeito terapêutico. Transferindo cópias funcionais do gene relevante para o paciente, a correção de características reversíveis do fenótipo mutante deve, em princípio, ser possível. A cura genética *permanente* de uma doença humana herdada ainda não foi demonstrada, mas muitas tentativas clínicas estão sendo feitas para avaliar tanto a eficiência quanto a eficácia da terapia de transferência gênica. As principais conclusões de um painel do National Institutes of Health em 1995 sobre a situação e as perspectivas da terapia gênica ainda estão de pé: o progresso neste campo tem sido lento, a ênfase das pesquisas nem sempre tem sido apropriada e as primeiras notícias de eficácia foram superestimadas. Entretanto, o painel concluiu que a longo prazo a terapia gênica é promissora para o tratamento de doenças humanas.

Os estudos pré-clínicos em animais e as tentativas iniciais em humanos sugerem que a terapia gênica será bem-sucedida em várias doenças, embora muitas dificuldades tenham que ser superadas. Como descrito mais adiante, uma tentativa em dois pacientes com uma forma de SCID parece ter corrigido a doença, pelo menos a curto prazo. Um outro estudo de terapia gênica do fator IX em três pacientes com hemofilia B não teve efeitos prejudiciais e apresentou uma modesta melhoria clínica. Nesta seção, destacaremos o potencial, os métodos e as prováveis limitações da transferência gênica para o tratamento das doenças genéticas humanas. Os requisitos mínimos que devem ser atendidos antes que o uso da transferência gênica possa ser considerado para o tratamento de um distúrbio genético são apresentados no boxe (ver adiante).

Terapia Gênica: Considerações Gerais

A meta da terapia gênica é melhorar a saúde do paciente pela correção do fenótipo mutante. Para este fim, é necessário o endereçamento do gene normal para as células *somáticas* apropriadas (em oposição à linhagem germinativa). Independente das dificuldades éticas e técnicas envolvidas, não é necessário nem desejável alterar a linhagem germinativa do paciente que está sendo tratado de uma doença genética. Um risco é que qualquer esforço para integrar uma cópia normal de um gene à linhagem germinativa (ou a um zigoto) teria um risco substancial de introduzir uma mutação nova.

A introdução de um gene nas células somáticas pode ser necessária para um dentre três propósitos (Fig. 13.12). Primeiro, a terapia gênica deve ser capaz de **compensar** um gene celular mutante que tenha uma mutação de perda de função. Para tais doenças, a introdução de cópias normais funcionais de um gene seria suficiente para corrigir um fenótipo reversível, tal como o aumento do nível de fenilalanina na PKU (neste caso, o gene ou genes mutantes do paciente são deixados no local). Nestes casos, em geral não seria importante em que lugar do genoma de uma célula o gene transferido seria inserido. Para funcionar em uma célula na qual foi introduzido, o produto do gene transferido precisaria ter acesso a co-fatores apropriados ou a outras moléculas essenciais para seu funcionamento. Por exemplo, o co-fator para a fenilalanina hidroxilase, a tetraidrobiopterina ou BH_4 (ver Cap. 12), teria que ser dado oralmente se esta enzima fosse introduzida na medula óssea ou nas células musculares, que normalmente não produzem BH_4.

Requisitos Mínimos da Terapia Gênica Para um Distúrbio Genético

1. Identificação do locus afetado ou pelo menos da base bioquímica do distúrbio.
2. Um clone de DNA complementar (cDNA) do gene, o próprio gene (particularmente se não for grande) ou uma versão funcional do gene do qual foram removidos os componentes que não são cruciais para reduzir seu tamanho.
3. Um prejuízo substancial da doença e uma relação risco/benefício favorável em comparação com a terapia alternativa.
4. Um conhecimento suficiente da base molecular da doença para se ter segurança de que a transferência gênica tem probabilidade de melhorar ou corrigir a patologia bioquímica e evitar ou reverter as anomalias fenotípicas críticas. Embora as mutações de perda de função vão exigir a substituição por um gene funcional, alguns alelos dominantes, tais como os alelos dominantes negativos, vão exigir a inativação do gene mutante ou de seus produtos.
5. Componentes reguladores apropriados para a transferência gênica. Uma rígida regulação do nível de expressão gênica é relativamente sem importância em algumas doenças e crucial em outras. Na talassemia, por exemplo, a hiperexpressão do gene transferido causaria um novo desequilíbrio de cadeias de globina, enquanto os baixos níveis de expressão seriam inefetivos. Em contraste, em algumas enzimopatias, os níveis anormalmente altos de expressão podem não ter efeito adverso.
6. Uma célula-alvo apropriada com, em termos ideais, uma meia-vida longa ou bom potencial replicativo *in vivo*.
7. Dados adequados de células cultivadas e estudos animais para indicar que o vetor, o gene construído e a célula-alvo são tanto eficazes quanto seguros.
8. Revisão do protocolo e aprovação por uma comissão institucional de revisão e, em muitos países, uma supervisão de uma agência governamental.

Segundo, a terapia gênica pode ser feita para **substituir ou inativar** um gene mutante dominante cujo produto anormal causa a doença (geralmente dominante). A substituição de todo um gene mutante ou de parte dele no locus normal é muito mais difícil. Esta estratégia seria necessária, por exemplo, para substituir um gene de doença de Huntington contendo uma repetição CAG ampliada ou pelo menos a maior parte da própria expansão CAG. Como alternativa, a "cirurgia" gênica deste tipo também poderia ser obtida pela modificação ou degradação do RNA mutante e não do gene que o codifica. Por exemplo, a degradação seletiva de um mRNA mutante que codifica um próα_1 (I) dominante negativo que causa a osteogênese imperfeita (ver Cap. 12) deveria, em princípio, evitar as anomalias ósseas deste distúrbio. Os genes terapêuticos que codificam as enzimas de RNA, ou ribozimas, destinadas a degradar apenas o mRNA do alelo mutante mostraram-se muito promissores nos estudos laboratoriais. Embora tais métodos provavelmente sejam factíveis, este tipo de pesquisa de terapia gênica ainda está em seus estágios iniciais. Terceiro, a terapia gênica deve ser mais amplamente usada para obter um **efeito farmacológico** para contrabalançar os efeitos de um gene celular mutante ou para compensar de algum outro modo a patogenia da doença. Os pacientes com doenças adquiridas, inclusive o câncer, provavelmente serão beneficiados por esta estratégia (ver Fig. 13.12, B-D).

Nesta discussão, usamos o termo "gene transferido" para nos referir a qualquer DNA construído que contenha as seqüências codificantes do gene em questão, sob o controle dos elementos reguladores apropriados. Com mais freqüência, um gene transferido consiste em um cDNA sob o controle de um promotor que pode não ser necessariamente o promotor natural do gene (Fig. 13.13). Os elementos reguladores devem ser escolhidos de modo que o gene seja transcrito nas células-alvo em níveis adequados e, se necessário, responda a sinais reguladores essenciais.

A Célula-alvo

Uma das considerações cruciais na escolha de uma célula-alvo apropriada é que ela tenha uma meia-vida longa *in vivo* ou um potencial replicativo significativo, de modo que o efeito biológico da transferência possa ser de duração útil. As células-alvo ideais são células-tronco (que são auto-replicativas) ou células genitoras com substancial potencial replicativo. A introdução do gene nas células-tronco pode resultar na expressão do gene transferido em uma grande população de células filhas. No momento, a medula óssea é o único tecido para o qual podem ser usadas células-tronco ou células genitoras como receptoras dos genes transferidos. A transferência de medula óssea será apropriada tanto para doenças que afetam células sanguíneas, tais como a talassemia e anemia falciforme, quanto para outras doenças que não envolvem o sistema sanguíneo em si (p. ex., a PKU). No último caso, a circulação levaria o substrato para a enzima na medula e também removeria o produto. A terapia de transferência gênica para as células-tronco do sangue provavelmente também é efetiva para o tratamento de doenças de armazenamento, para as quais o transplante de medula óssea tem sido efetivo (ver discussão anterior).

Outras estratégias devem ser usadas para as células que não podem se dividir muito em cultura e então ser reimplantadas no paciente, ou que não têm células-tronco identificáveis ou células genitoras no animal maduro. Por exemplo, os hepatócitos podem ser mantidos por um breve período em culturas primárias transfectadas com um gene e então são retornadas para o animal. Como alternativa, a introdução direta do gene nas células-alvo *in vivo* (p. ex., por injeção) foi demonstrada em muitos tipos de células, incluindo o fígado e o músculo. As células endoteliais podem se revelar como alvos particularmente úteis para a transferência gênica porque revestem as paredes dos vasos sanguíneos. O produto proteico de um gene expresso nas células endoteliais pode ser liberado na circulação para atingir um efeito sistêmico. Uma consideração logística importante surge com todos estes enfoques: o número de células nas quais o gene deve ser introduzido tem que ser muito grande. Por exemplo, o número aproximado de células hepáticas para as quais o gene deve ser transfectado para corrigir um típico erro hereditário do metabolismo, tal como a PKU, é de cerca de 5% da massa de hepatócitos, ou cerca de 10^{10} células (supondo-se que o nível de expressão do gene transferido é similar ao do tipo selvagem).

Não se deve esquecer que a célula-alvo também deve fornecer quaisquer proteínas adicionais ou ligandos necessários à atividade biológica do polipeptídeo (ver Quadro 11.1).

Estratégias de Transferência Gênica

Um gene apropriadamente criado deve ser transferido para as células-alvo por uma de duas estratégias gerais (ver Fig. 13.13). A primeira envolve a introdução *ex vivo* do gene nas células que foram cultivadas do paciente, as quais são reintroduzidas após a transferência gênica. No segundo enfoque, o gene é injetado diretamente *in vivo* no tecido ou no líquido extracelular de interesse (do qual é seletivamente captado pelas células-alvo). O direcionamento deste tipo em geral é obtido modificando-se o envoltório de um vetor viral, de modo que apenas as células destinadas ligam-se às partículas virais.

Transferência de DNA nas Células: Vetores Virais

O vetor ideal para a terapia gênica tem que ser seguro, prontamente feito, de fácil introdução no tecido-alvo apropriado e precisa gerar uma longa expressão do gene de interesse em níveis apropriados. No momento, não foi identificado nenhum vetor, viral ou não-viral, que atenda a todos estes critérios. Na verdade, provavelmente nenhum vetor isolado é satisfatório em todos os aspectos para todos os tipos de terapia gênica (ver Fig. 13.12), e é provável que um repertório de vetores seja necessário. Aqui, veremos resumidamente três das classes de vetores virais mais usadas, as derivadas de **retrovírus, adenovírus** e **vírus adeno-associados**.

Uma das classes de vetores mais usadas é derivada dos retrovírus, vírus simples a RNA com apenas três genes estruturais que podem ser removidos e substituídos pelo gene a ser transfectado (ver Fig. 13.13). Uma vantagem importante dos vetores virais é que eles são capazes de entrar em praticamente cada célula da população-alvo. A geração atual de vetores retrovirais foi projetada para se tornar incapaz de replicação. Seus outros méritos incluem os seguintes fatos: não são tóxicos para a célula, apenas um baixo número de cópias do DNA viral (com o gene transferido) se integra ao genoma hospedeiro, o DNA integrado é estável e os vetores retrovirais podem acomodar grandes segmentos de DNA adicionado (de até 8 kb), sendo espaçosos o suficiente para acomodar muitos genes (mas nunca todos) que poderiam ser transferidos. Uma limitação importante de muitos vetores retrovirais é que o DNA viral não se integra ao DNA hospedeiro das células que não se dividem, o que impede o uso de tais vetores em muitos tecidos. Os **lentivírus**, entretanto, a classe de retrovírus que inclui o vírus da imunodeficiência humana, podem ser capazes de se integrar ao DNA de muitas células de divisão

METAS DA TERAPIA GÊNICA

Exemplo 1: Gene afeta a célula

Aerossol viral ou de lipossomos

Produto

Célula morre

Produto ausente ou defeituoso é reposto.
Exemplo de aplicação: O gene CFTR é direcionado para o epitélio das vias respiratórias em um paciente com fibrose cística.

Produto mata ou inibe crescimento das células.
Exemplo de aplicação: As células tumorais recebem fator de necrose tumoral ou gene TK seguido de tratamento com ganciclovir.

Exemplo 2: Gene afeta tecido vizinho ou distal

Células implantadas

Tecido cardíaco doente devido a infarto do miocárdio

Produto afeta tecidos vizinhos.
Exemplo de aplicação: O implante de células ou injeção de DNA leva à produção de fatores de crescimento que estimulam a angiogênese

Produto afeta tecido distal.
Exemplo de aplicação: O implante de mioblastos geneticamente alterados ou injeção de DNA plasmidial resulta em músculo que secreta proteínas circulatórias ausentes.

Fig. 13.12 Quatro tipos de terapia gênica. CFTR indica o regulador de condutância transmembranar de fibrose cística e TK indica timidina cinase do vírus da herpes simples. O exemplo D ilustra a estratégia usada em um dos primeiros experimentos de terapia gênica humana que comprovadamente teve algum benefício clínico, a injeção e a expressão do gene do fator IX no músculo de pacientes com hemofilia B (ver texto). (Reproduzido com permissão de Blau H. M., Springer M. L. [1995] Gene therapy — a novel form of drug delivery. N Engl J Med 333:1204-1207, copyright © 1995 Massachusetts Medical Society. Todos os direitos reservados.)

lenta ou células que não se dividem, incluindo os neurônios. Os primeiros trabalhos experimentais oferecem a esperança de que estes vetores possam de fato ser adequados ao tratamento de distúrbios neurológicos.

Os vetores adenovirais têm as vantagens de poderem ser obtidos em alto título, de infectarem uma grande variedade de tipos celulares, com ou sem divisão, e de poderem acomodar inserções de 30 a 35 kb. Sua principais limitações são ser epissomos e expressos apenas temporariamente (semanas) nas células-alvo e o fato de as proteínas virais provocarem fortes respostas imunes e inflamatórias. Os vírus adeno-associados, em contraste, são muito comuns na população humana e não têm efeitos adversos conhecidos. Além disso, infectam células com e sem divisão em uma administração *in vivo* e podem existir seja epissômica ou estavelmente integrados ao cromossomo hospedeiro. As desvantagens incluem o fato de que os atuais vetores virais adeno-associados podem acomodar inserções de até 5 kb apenas.

Elementos reguladores determinando:
– quantidade de expressão
– histoespecificidade
– época de expressão
Seqüências codificantes de proteína (cDNA)
Plasmídeo
Promotor/ acentuador
"Gene" humano funcional
Elementos reguladores
Seqüência codificante de proteínas
DNA viral
"Gene" humano funcional
DNA viral
Plasmídeo
Células do paciente em cultura
Gene funcional compactado em vetor viral
Paciente

Fig. 13.13 As duas estratégias que podem ser usadas para transferir um gene para um paciente com uma doença genética, com base na expressão de um gene humano modificado para uso na transferência gênica usando um vetor plasmidial (*direita*) ou com base em um vetor retroviral contendo um cDNA humano (*esquerda*). Os componentes virais no final da molécula são necessários para a integração do vetor no genoma do hospedeiro

Transferência de DNA para as Células: Vetores Não-virais

Em princípio, os vetores não-virais são atraentes porque não têm riscos biológicos (p. ex., contaminação viral) associados aos vetores virais e porque sua preparação, pelo menos teoricamente, é mais direta. Os vetores não-virais são de quatro tipos gerais:

1. **DNA descoberto**, por exemplo, um cDNA com elementos reguladores em um plasmídeo;
2. **DNA embalado em lipossomos**, uma camada dupla contínua de lipídeos envolvendo um volume aquoso;
3. **Conjugados proteína-DNA**, nos quais o DNA forma complexo com uma proteína — tal como um peptídeo que se liga a um receptor de superfície celular —, o que facilita a entrada do complexo nas células ou em um compartimento subcelular; e
4. **Cromossomos artificiais**, nos quais os componentes funcionais mínimos de um cromossomo natural (ver Cap. 3) são combinados ao cDNA ou gene de interesse, com os elementos reguladores apropriados

Embora o potencial dos vetores não-virais seja substancial, seu sucesso geral tem sido limitado. As principais dificuldades são: o DNA introduzido por estes vetores tende a ser captado por lisossomos e degradado e, além disso, o DNA que escapa deste destino não é eficientemente captado pelo núcleo. Além do mais, cada um dos sistemas não-virais tem seus problemas característicos. Por exemplo, o endereçamento de DNA descoberto é altamente ineficiente, embora possa ser muito útil se puder ser injetado diretamente no tecido de interesse e quando é necessário apenas um efeito passageiro, como no tratamento de malignidades. Os lipossomos são difíceis de direcionar para o tecido de interesse, e o planejamento e a construção de cromossomos artificiais ainda estão em um estado inicial. Além disso, a introdução de grandes cromossomos artificiais (potencialmente bem acima de um megabase de tamanho) em um número substancial de células é difícil, exceto por injeção direta. Assim, a tecnologia e a biologia de vetores não-virais ainda está em estágio muito inicial para nos permitir definir seu verdadeiro potencial de tratamento de doença.

Riscos de Terapia Gênica

A terapia gênica para o tratamento de doenças humanas tem riscos tanto demonstrados quanto teóricos que são de três tipos gerais. Primeiro, pelo menos um paciente morreu, aparentemente de uma reação adversa ao vetor adenoviral com o qual foi injetado. Assim, a principal preocupação é que o paciente tenha uma reação adversa ao vetor ou ao gene transferido. Tais problemas devem ser amplamente antecipados com estudos animais e humanos preliminares apropriados. Segundo, é a preocupação de que o gene transferido se integre ao DNA do paciente e ative um proto-oncogene ou perturbe um gene supressor tumoral, possivelmente levando à malignidade (ver Cap. 16). A expressão ilícita de um oncogene tem menos probabilidade de ocorrer com a geração atual de vetores virais, os quais foram alterados para diminuir a capacidade de seus promotores de ativar a expressão de genes hospedeiros adjacentes. A ativação insercional de um

gene supressor tumoral provavelmente é infreqüente e, como tal, é um risco aceitável nas doenças para as quais não há alternativa terapêutica.

Um terceiro risco — que a ativação insercional possa perturbar um gene essencial — em geral não tem efeito significativo, pois tais mutações letais são raras e matarão apenas algumas células. Como o sítio de integração de um vetor viral é mais ou menos aleatório, há pouca chance de que o mesmo gene seja danificado em mais de uma célula. A única exceção a esta situação aplica-se à linhagem germinativa: uma inserção em um gene da linhagem germinativa poderia criar uma mutação dominante causadora de doença. Tais eventos, entretanto, provavelmente são raros e o risco é aceitável, pois seria difícil justificar a recusa de tentativas cuidadosamente planejadas e revisadas de terapia gênica a pacientes que não têm outro recurso. Além disso, o problema da modificação da linhagem germinativa pelo tratamento para doenças não está confinado à terapia gênica. Por exemplo, a maior parte da quimioterapia usada no tratamento de malignidades é mutagênica, mas este risco é aceito devido aos benefícios terapêuticos.

Considerações Éticas

Como em qualquer tratamento novo, as propostas de tentativas de transferir genes para pacientes devem ser submetidas a um rigoroso escrutínio pelas agências reguladoras e pelos comitês de ética hospitalar. Entretanto, quase todas as agências governamentais e religiosas que examinaram as propostas para a terapia gênica humana de tratamento de doenças genéticas concordaram que esta oportunidade terapêutica deve ser perseguida. Em contraste com a transferência de genes para a linhagem germinativa, a terapia de células somáticas levanta alguns aspectos éticos que não são rotineiramente considerados quando outra terapia nova é avaliada (p. ex., uma nova droga contra o câncer).

Algumas Doenças Candidatas à Terapia Gênica

Muitos distúrbios monogênicos, alguns dos quais já foram mencionados na discussão anterior, são candidatos potenciais à correção por terapia gênica. Eles incluem condições hematopoéticas tais como a talassemia, a hemofilia e várias formas de imunodeficiência, bem como distúrbios tais como a PKU, os distúrbios do ciclo da uréia, a FH e a deficiência de α_1-AT, cada uma afetando proteínas produzidas no fígado. Considerações adicionais relevantes ao uso da terapia gênica para quatro distúrbios importantes são destacadas aqui.

Imunodeficiência Combinada Grave. A primeira cura possível de uma doença herdada pela terapia gênica foi relatada no início de 2000. Cada um dos dois pacientes tratados tinha uma forma de SCID (ver Cap. 14), SCID-X1, devida a mutações no gene ligado ao X codificante da subunidade receptora de citocina γc de vários receptores de interleucina. A deficiência de receptor causa um bloqueio inicial no crescimento de linfócitos T e *natural killer* (NK), na sobrevida e na diferenciação. Embora um transplante bem-sucedido de medula óssea possa salvar a vida neste distúrbio, os pacientes com SCID-X1 que recebem transplantes têm um funcionamento extremamente pobre de células B. Cuidadosos estudos pré-clínicos sugeriram que uma tentativa clínica provavelmente seria segura e efetiva. As células-tronco da medula óssea dos pacientes foram infectadas em cultura (*ex vivo*) com um vetor retroviral que expressou a subunidade γc de cDNA. Uma vantagem seletiva foi conferida às células transduzidas, porque a subunidade transmite sinais de sobrevida às genitoras de células T e sinais proliferativos às genitoras de linfócitos NK.

Dez meses após a transferência gênica, células T e NK expressando o transgene de subunidade γc ainda eram detectadas nos pacientes, e as contagens de células T, B e NK e o funcionamento foram restaurados aos níveis dos controles de mesma idade. Além disso, ocorreu uma acentuada melhora clínica, com a resolução da diarréia e das lesões de pele, bem como restauração do crescimento e desenvolvimento normais. Não foram observados efeitos adversos. A questão crucial agora é se a correção é permanente. A sobrevida continuada das células-tronco transduzidas aparentemente responsável pelos benefícios deve ser documentada, e a expressão do gene transferido deve ser mantida. Independente do resultado a longo prazo deste sucesso inicial, entretanto, os resultados demonstram o grande potencial da terapia gênica para a correção da doença humana herdada.

Hemofilia B. Este distúrbio de sangramento ligado ao X, que resulta de mutações no gene do fator IX, é outra doença monogênica para a qual a terapia gênica tem demonstrado convincentemente um efeito clínico, embora modesto. O fator IX é uma pró-enzima necessária para a formação de um coágulo de fibrina. A hemofilia B grave surge quando o nível do fator IX circulante é menor que 1% do normal. Uma doença mais branda ocorre com níveis entre 1% e 5%. A infusão regular de concentrados do fator de coagulação para manter os níveis acima de 1% impede as muitas complicações do sangramento, inclusive os danos nas articulações.

O potencial de uma tentativa de terapia gênica em pacientes com hemofilia B foi sugerido por estudos de animais com deficiência do fator IX. Em dois pacientes, a terapia gênica com um vírus adeno-associado contendo fator IX injetado no músculo esquelético levou a um aumento muito pequeno nos níveis do fator IX, para cerca de 1% em um paciente e ainda menos em um segundo paciente. Mais importante: as necessidades de infusões do fator IX nestes dois pacientes caiu em 50% em um e em 80% no outro por períodos de pelo menos 3 meses. Não foram observados efeitos prejudiciais, não ocorreu transmissão de linhagem germinativa e não ocorreram anticorpos inibidores do fator IX. Como estes pacientes foram os primeiros tratados em um projeto experimental de escalonamento de dose e receberam as menores doses do vetor, espera-se que doses maiores sejam ainda mais benéficas.

Distrofia Muscular Duchenne. O problema especial na DMD é o tamanho (11 kb) do cDNA de distrofina que codifica a proteína, muito grande para ser acomodado pela atual geração de vetores retrovirais. Entretanto, a identificação de um paciente com distrofia muscular Becker branda o suficiente para permitir que ele dirija seu automóvel aos 65 anos sugere que pode não ser necessário usar toda a região codificante de distrofina para a transferência gênica. Neste paciente, o alelo mutante (ver Fig. 12.16) não tem quase metade da região codificante, de modo que seqüências altamente repetidas no domínio da distrofina foram deletadas. A distrofina encurtada conserva uma função suficiente para evitar o fenótipo completo da DMD. Estes achados destacam a necessidade de pesquisas básicas para identificar os domínios funcionais críticos de uma proteína, de modo que eles possam ser conservados em qualquer cDNA terapêutico. Como já foi dito com relação à hemo-

filia B, a injeção direta de vetores no músculo pode ser efetiva e indica um enfoque potencial para colocar um gene de distrofina nos pacientes com DMD. Uma segunda dificuldade maior com qualquer terapia de transferência gênica para a DMD, entretanto, é a necessidade de que o gene seja colocado em uma fração significativa da massa do músculo esquelético (e, em alguns pacientes, também no músculo cardíaco). Esta é uma imensa barreira logística.

Deficiência de Adenosina Desaminase. Os primeiros estudos de transferência gênica para o tratamento de um paciente com uma doença monogênica foram feitos em 10 pacientes com deficiência de ADA, outra causa de SCID (ver Fig. 13.7). Esta condição foi escolhida porque o transplante de medula óssea cura a condição e porque se acreditava que as células portadoras do gene transferido teriam uma vantagem seletiva de sobrevida. Os linfócitos T autólogos foram tratados *ex vivo* com vetores retrovirais que expressam cDNA de ADA e então reintroduzidos no paciente (as células T vivem bastante, algumas durante anos). Muitos dos problemas que caracterizam a terapia gênica humana em geral são exemplificados por estas tentativas iniciais de ADA. Pelo menos duas diferenças principais podem contribuir para o tratamento bem-sucedido dos pacientes com SCID-X1 e a falta de sucesso nos esforços iniciais da terapia nos pacientes com deficiência de ADA. Primeiro, em contraste com a poderosa seleção de células transduzidas nos pacientes com SCID-X1, a pressão seletiva foi diminuída nos pacientes com deficiência de ADA pela administração concomitante da terapia de reposição de enzima PEG-ADA, que todos os pacientes com deficiência de ADA continuaram a receber. Segundo, a tecnologia de transferência gênica melhorou consideravelmente entre o início da década de 1990, quando foram feitas as tentativas com ADA, e o ano 2000, quando os dois pacientes com SCID-X1 foram tratados. Assim, a eficiência de transdução (transferir o DNA para a célula-alvo) foi baixa na tentativa com ADA, como foram os níveis de expressão de ADA na maioria dos casos. Embora algumas células T circulantes continuem a expressar o gene introduzido em níveis baixos, nenhum benefício clínico foi atribuído à terapia gênica.

Problemas

1. A doença granulomatosa ligada ao X (CGD) é um distúrbio incomum caracterizado por um defeito na defesa do hospedeiro que leva a infecções piogênicas graves, recorrentes e em geral fatais que começam no início da infância. O locus *CGD* ligado ao X codifica a cadeia pesada de citocromo-*b*, um componente da oxidase que gera superóxido nos fagócitos. Como se sabia que o interferon-γ (IFN-γ) aumentava a atividade de oxidase dos fagócitos normais, ele foi administrado a meninos com CGD ligada ao X para ver se sua atividade de oxidase aumentava. Antes do tratamento, os fagócitos de *alguns* pacientes afetados de modo menos grave tinham picos detectáveis mas pequenos de atividade de oxidase (ao contrário dos pacientes gravemente afetados), sugerindo que o aumento de atividade nestas pessoas afetadas com menor gravidade é o resultado de uma maior produção de citocromo-*b* pelo locus afetado. Nestes casos menos graves, o IFN-γ aumentou o conteúdo de citocromo-*b*, a produção de superóxido e a morte de *Staphylococcus aureus* nos granulócitos. O efeito do IFN-γ foi associado a um aumento definido na quantidade de cadeias de citocromo-*b*. Supostamente, o polipeptídeo citocromo-*b* destes pacientes é parcialmente funcional, e o aumento de expressão da função residual melhorou o defeito fisiológico. Descreva as diferenças genéticas que podem contribuir para o fato de que os fagócitos de alguns pacientes com CGD ligada ao X respondam ao IFN-γ *in vitro* e outros não.

2. Identifique algumas das restrições dos tipos de proteínas que podem ser consideradas na terapia de reposição extracelular, como exemplificado por PEG-ADA. O que torna este enfoque impróprio para a deficiência de fenilalanina hidroxilase? E para a síndrome de Hurler? E para a síndrome de Lesch-Nyhan? Se a doença de Tay-Sachs causasse apenas doença hepática, esta estratégia seria bem-sucedida? Caso não, por quê?

3. Uma menina com 3 anos de idade, Rhonda, tem FH devida a uma deleção da ponta 5' do gene. A mutação removeu o promotor e os primeiros dois éxons de cada alelo. (Os genitores de Rhonda são primos em segundo grau.) Você explica aos genitores que ela vai precisar de uma terapia de troca de plasma a cada 1 a 2 semanas durante anos. Na clínica, entretanto, eles encontram outra família com um menino de 5 anos com a mesma doença. O menino foi tratado com medicamentos com algum sucesso. Os genitores de Rhonda querem saber por que não foi oferecida a ela uma terapia farmacológica similar. Explique.

4. Que classes de mutações provavelmente são encontradas nos pacientes com homocistinúria que não respondem à administração de grandes doses (1.000 mg/dia) de piridoxina (vitamina B_6)? Como você pode explicar o fato de que Tom é totalmente responsivo, enquanto seu primo em primeiro grau, Allan, tem apenas uma redução parcial de homocistina do plasma quando recebe a mesma quantidade de vitamina B_6?

5. Você clonou o gene para fenilalanina hidroxilase e quer introduzi-lo em pacientes com PKU. Seu enfoque será cultivar células do paciente, introduzir uma versão funcional do gene nas células e reintroduzir as células no paciente.
   (a) Que componentes do DNA você precisa para fazer uma fenilalanina hidoxilase funcional em um experimento de transferência gênica?
   (b) Que tecidos você escolheria para expressar a enzima e por quê? Como esta escolha afeta sua construção gênica em (a)?
   (c) Você introduziu sua versão do gene em uma cultura de fibroblastos de uma amostra de biópsia de pele do paciente. A análise da transferência Northern (RNA) mostra que o RNA mensageiro está presente em quantidades normais e tem o tamanho correto. Entretanto, nenhuma proteína fenilalanina hidroxilase pode ser detectada nas células. Que tipos de anomalias no gene transferido explicariam este achado?
   (d) Você corrigiu todos os problemas identificados em (c). Ao introduzir a nova versão do gene nas células cultivadas, você agora descobre que a fenilalanina hidroxilase está presente em grande quantidade, e quando você colhe as células e dosa a enzima (na presença de todos os componentes necessários), é obtida a atividade normal. Entretanto, quando você adiciona fenilalanina marcada com ^3H às células em cultura, não se forma nenhuma tirosina marcada com ^3H (em contraste, algumas células hepáticas cultivadas produzem uma grande quantidade de tirosina marcada com ^3H nesta situação). Quais as explicações mais prováveis para a não formação de ^3H-tirosina? Como este resultado afeta o seu enfoque da terapia gênica dos pacientes?
   (e) Você desenvolveu um método para introduzir sua versão funcional do gene diretamente em uma grande proporção dos hepatócitos dos pacientes com deficiência de fenilalanina hidroxilase. Inesperadamente, você descobre que níveis muito mais baixos de atividade enzimática de fenilalanina hidroxilase são obtidos nos pacientes nos quais eram detectáveis quantidades significativas de homodímero de fenilalanina hidroxilase inativa nos hepatócitos antes do tratamento do que nos pacientes que não tinham fenilalanina hidroxilase detectável antes do tratamento. Como você pode explicar este resultado? Como você poderia superar o problema?

Referências Gerais

Blau HM, Springer ML (1995) Gene therapy—A novel form of drug delivery N Engl J Med 333:1204–1207.

Desnick RJ (ed) (1991) Treatment of Genetic Diseases. Churchill Livingstone, New York.

Desnick RJ, Schuchman EH (1998) Gene therapy for genetic diseases. Acta Paed Japonica 40:191–203.

Kay M, Russell DW (2000) Gene therapy. *In* Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th ed. McGraw Hill, New York.

Orkin S, Motulsky A (1995) Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. See online at *http://www.nih.gov/news/panelrep.html*.

Rosenberg LE (1990) Treating genetic diseases: Lessons from three children. Pediatr Res 27:S10–S16.

Scriver CR, Treacy EP (1999) Is there treatment for "genetic" disease? Mol Gen Metab 68:93–102.

Treacy EP, Childs B, Scriver CR (1995) Response to treatment in hereditary metabolic disease: 1993 survey and 10-year comparison. Am J Hum Genet 56:359–367.

Treacy EP, Valle D, Scriver CR (2001) Treatment of genetic disease. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Referências Específicas a Tópicos Particulares

Anderson WF (2000) Perspectives: Gene therapy. The best of times, the worst of times. Science 288:627–629.

Atweh GF, Sutton M, Nassif I, et al (1999) Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. Blood 93:1790–1797.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint-Basile G, et al (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science 288:669–672.

Couture LA, Stinchcomb DT (1996) Anti-gene therapy: The use of ribozymes to inhibit gene function. Trends Genet 12:510–514.

Cox DW (2001) α_1-AT deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Friedmann T (2000) Medical ethics: Principles for human gene therapy studies. Science 287:2163–2165.

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. Science 287:1433–1438.

Giardini C (1997) Treatment of β-thalassemia. Curr Opin Hematol 4:79–87.

Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS (2001) Familial hypercholesterolemia. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Grabowski GA, Leslie N, Wenstrup R (1998) Enzyme therapy for Gaucher disease: The first 5 years. Blood Rev 12:115–133.

Hayes A, Costa T, Scriver CR, Childs B (1985) The effect of mendelian disease on human health. II: Response to treatment. Am J Med Genet 21:243–255.

Hershfield MS (1998) Adenosine deaminase deficiency: Clinical expression, molecular basis, and therapy. Semin Hematol 35:291–298.

Hollon T (2000) Researchers and regulators reflect on first gene therapy death. Nat Med 6:6.

Hoogerbrugge PM, Brouwer OF, Bordigoni P, et al (1995) Allogenic bone marrow transplantation for lysosomal storage diseases. Lancet 345:1398–1402.

Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. Nat Genet 24:257–261.

Kelly DA (1998) Current results of evolving indications for liver transplantation in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 27:214–221.

Krivit W, Shapiro EG, Peters C, et al (1998) Hematopoietic stem cell transplantation in globoid-cell leukodystrophy. N Engl J Med 338:1119–1126.

Miano M, Porta F, Locatellie F, et al (1998) Unrelated donor marrow transplantation for inborn errors. Bone Marrow Transplant 21:(Suppl 2) S37–S41.

Oliveri NF (1999) The β-thalassemias. N Engl J Med 341:99–109.

Parkman R (1998) The future of placental-blood transplantation. N Engl J Med 339:1627–1629.

Peters C, Shapiro EG, Anderson J, et al (1998) Hunter syndrome: II. Outcome of HLA-genotypically identical sibling and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children. Blood 91:2601–2608.

Rosenberg LE, Schechter AN (2000) Gene therapist, heal thyself. Science 287:1751.

Scriver CR, Kaufman S (2001) The hyperphenylalaninemias: Phenylalanine hydroxylase deficiency. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. McGraw-Hill, New York.

Starzl TE, Demetris AJ (1990) Liver transplantation: A 31-year perspective. Part I. Curr Probl Surg 27:49–116.

Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. Science 287:1442–1446.

Van der Kooy D, Weiss S (2000) Why stem cells? Science 287:1439–1441.

Genética do Sistema Imune

A organização e o controle do sistema imune demonstra vários fenômenos genéticos incomuns que são diferentes de outros sistemas: amplo polimorfismo de proteínas expressas, uma relação evolutiva óbvia entre seus vários componentes e, em especial, um sistema único para gerar grande diversidade usando relativamente poucos loci. Os genes do sistema imune são clinicamente importantes em relação aos transplantes, às doenças auto-imunes e à resposta às infecções. Eles também são os loci responsáveis por vários distúrbios monogênicos. A aplicação de técnicas moleculares ampliou muito a compreensão da resposta imune, ao mesmo tempo em que revelou novos níveis de complexidade que permanecem por ser explorados.

Os organismos superiores são únicos em sua capacidade de distinguir entre o "próprio" e o "não-próprio" e montar uma reação seletiva contra um espectro muito amplo de antígenos exógenos. Esta reação, que é mediada por uma complexa rede interativa de células e citocinas celulares do sistema imune, é chamada de **resposta imune**. Os fatores genéticos têm um papel importante não só na geração da resposta imune normal, mas também no desenvolvimento de reações imunes aberrantes e a conseqüente doença imunomediada. Neste capítulo descreveremos a base genética da resposta imune e discutiremos várias doenças nas quais os genes relacionados à imunidade, tais como os do **complexo principal de histocompatibilidade** (MHC), contribuem para a suscetibilidade à doença.

A discussão aqui não pretende fornecer uma revisão ampla de imunologia ou imunogenética, para as quais o leitor é encaminhado para as Referências Gerais citadas ao final do capítulo. Introduzimos alguns dos sistemas gênicos que controlam o funcionamento imune e reforçamos o conceito de que, com exceção dos gêmeos monozigóticos (ou trincas idênticas e outros nascimentos múltiplos), cada pessoa é geneticamente única. Grande parte da singularidade imunológica depende da expressão dos genes do MHC e, assim, na discussão que se segue, destacaremos este sistema gênico, bem como dois outros dentro da mesma superfamília que codificam componentes importantes adicionais da resposta imune: as **imunoglobulinas** (Igs) e os **receptores de antígenos de células T** (TCRs).

O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

O MHC é composto de um grande grupo de genes situados no braço curto do cromossomo 6 (Fig. 14.1). Com base nas diferenças estruturais e funcionais, estes genes são categorizados em três classes, cada uma das quais é altamente complexa e polimórfica. Duas das três classes, a classe I e a classe II, correspondem aos genes de antígenos leucocitários humanos (HLA), originalmente descobertos em virtude de sua importância no transplante de tecidos entre pessoas não-aparentadas. Estes antígenos estão envolvidos na rejeição dos transplantes e também são cruciais na imunocompetência. Eles estão complexamente envolvidos no reconhecimento de antígenos, nas interações de linfócitos e no desenvolvimento de auto-tolerância. Os genes de HLA classes I e II codificam proteínas de superfície celular que têm um papel crucial no início de uma resposta imune e especialmente na "apresentação" do antígeno aos linfócitos T *helper* $CD4^+$ e linfócitos citotóxicos $CD8^+$, que não podem reconhecer e responder a um antígeno a menos que estejam em complexo com uma molécula de HLA na superfície da célula que apresenta o antígeno.

Os genes de classe I (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) codificam antígenos que são uma parte integral da membrana plasmática das células nucleadas (Fig. 14.2). Um antígeno classe I consiste em duas subunidades polipeptídicas, uma cadeia pesada variável codificada no MHC e um polipeptídeo não-polimórfico, a β_2-microglobulina, que é codificada por um gene fora do MHC, mapeado no cromossomo 15. O sistema imune em geral reconhece e responde não a uma proteína inteira, mas a fragmentos peptídicos derivados da proteína. Os antígenos peptídicos derivados de proteínas intracelulares são gerados por degradação proteolítica por uma protease multifuncional (LMP). Os peptídeos são então transportados por um transportador associado ao processamento do antígeno (TAP) para a superfície da célula e ligados a uma molécula classe I que apresenta o antígeno peptídico às células T citotóxicas (ver Fig. 14.2).

O locus classe II é composto de várias sub-regiões que codificam antígenos de superfície celular, tais como *HLA-DP*, *HLA-DQ* e *HLA-DR*, bem como outras proteínas polimórficas, tais como TAP e LMP, que não são moléculas de superfície celular, mas estão envolvidas no processamento de antígenos para apresentação. Como os antígenos classe I, as moléculas classe II são integrantes da membrana celular. As moléculas classe II são expressas primariamente nos linfócitos B, nos macrófagos e nos linfócitos T ativados, mas sob certas condições elas também podem se expressar por outros tipos de células. Cada molécula classe II é um heterodímero, composto de subunidades α e β, ambas as quais são codificadas pelo MHC. Sintetizados no retículo endoplasmático e liberados nos endossomos, os heterodímeros classe II são ligados a uma proteína invariante, Ii, que deve ser removida pela proteína DM para que a molécula classe II se ligue a antígenos peptídicos situados

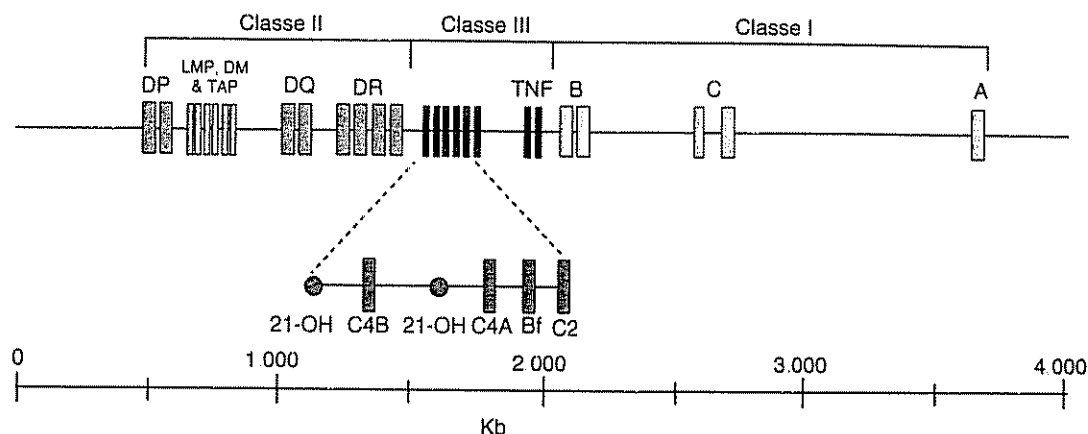



Fig. 14.1 Um esquema do complexo principal de histocompatibilidade no cromossomo 6p. DP, DQ e DR = genes de antígeno classe II; B, C e A = genes de antígeno classe I; LMP = genes que codificam componentes de grande protease multifuncional; DM = heterodímero de genes *DMA* e *DMB* codificando a molécula processadora de antígeno necessária para a ligação do peptídeo aos antígenos classe II do MHC; TAP = transportador associado ao processamento de antígeno; TNF = fator de necrose tumoral; Bf = fator B de properdina; C2, C4A; C4B = componentes do complemento; 21-OH = 21-hidroxilase (Um dos loci de 21-OH é um pseudogene) Para discussão, ver o texto

dentro de endossomos que foram originalmente derivados de proteínas que sofreram endocitose.

Os genes classe III não são genes de HLA, mas incluem genes para proteínas séricas polimórficas e receptores de membrana intimamente envolvidos na função imune, tal como o fator properdina Bf e as proteínas de complemento C2 e C4 (ver Fig. 14.1). Vários outros loci gênicos dentro do MHC são geneticamente ligados aos genes de HLA, mas em termos funcionais não estão relacionados a eles. Estes incluem os genes para os fatores de necrose tumoral, bem como outros genes que, quando defeituosos, causam doenças, tais como o gene para 21-hidroxilase, envolvido na **hiperplasia adrenal congênita**, e o gene para **hemocromatose**, uma doença hepática causada por sobrecarga de ferro. Estes genes parecem não funcionar na determinação de histocompatibilidade ou nas respostas imunes.

Há uma incrível semelhança, tanto em organização quanto em seqüência de DNA, entre os genes de HLA classe I e classe II e entre os genes de HLA e os genes de imunoglobulina e de receptores de células T descritos nas seções que se seguem. A similaridade entre estes genes e vários outros genes que codificam moléculas de superfície celular levaram à

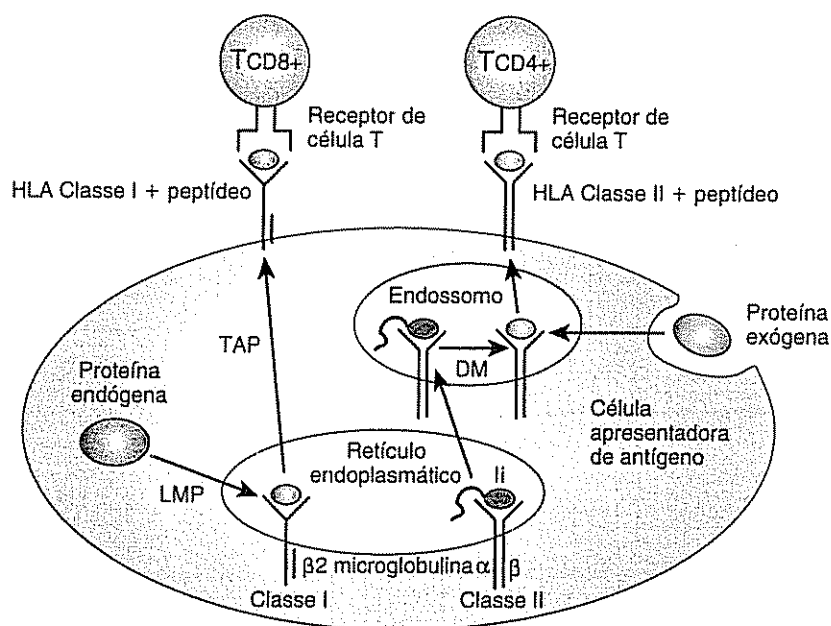



Fig. 14.2 Representação esquemática da interação de moléculas classe I e classe II do MHC, proteínas exógenas e receptores de células T. LMP = grande protease multifuncional; TAP = transportador associado ao processamento de antígeno; Ii = cadeia invariável; DM = heterodímero codificado pelos genes *DMA* e *DMB*; $CD8^+$ = células T citotóxicas; $CD4^+$ = células T helper (Adaptado com permissão de Elsevier Science, de Thorsby E (1997) HLA associated diseases Hum Immunol 53:1-11, copyright 1997 da American Society of Histocompatibility and Immunogenetics.)

sua classificação em uma família de genes chamada de **superfamília de genes de imunoglobulina**. Os membros da família parecem ser genes evolutivamente relacionados, cujos produtos servem a uma ampla variedade de funções além do papel imunológico das moléculas de HLA, imunoglobulinas e receptores de células T.

Polimorfismos e Herança de Haplótipos de HLA

O sistema HLA é extraordinariamente polimórfico. Numerosas variantes antigênicas distintas já foram reconhecidas nos loci *HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ* e *HLA-DR*. O Quadro 14.1 indica a complexidade e o amplo polimorfismo do sistema. De acordo com o sistema tradicional de nomenclatura de HLA, os diferentes alelos foram distintos uns dos outros com base em suas reações frente a um painel de anti-soros obtidos de mulheres multíparas que haviam desenvolvido naturalmente anticorpos contra antígenos HLA paternos expressos por seus fetos. Algumas destas variantes antigênicas (especificidades) são o resultado direto de diferenças de aminoácidos em cadeias α ou β particulares. Outras variantes resultam de mudanças em α e β. À medida que os genes responsáveis por codificar os antígenos de MHC classe I e classe II foram identificados e seqüenciados, o número de alelos de HLA aumentou enormemente. Como resultado, pode-se demonstrar que muitos alelos de HLA a princípio definidos serologicamente consistem em dois ou mais alelos, porque foram encontradas variantes de seqüências de DNA. Por exemplo, existem 12 variantes diferentes de seqüência de ácido nucleico do gene *HLA-B* no que antes foi definido como um único alelo B27 por teste sorológico! Assim, o MHC consiste em um grupo dos genes mais polimórficos no genoma. Um grande número destes polimorfismos, mas não todos, resulta em variantes estruturais (e, portanto, antigênicas) de proteínas de superfície celular que estão crucialmente envolvidas na defesa imune.

Os alelos de HLA em um determinado cromossomo são ligados tão proximamente que são transmitidos juntos, como um **haplótipo** (ver Cap. 8). Os alelos são co-dominantes. Cada genitor tem dois haplótipos, expressa ambos e, como mostra a Fig. 14.3, transmite um ou o outro para cada filho. Em conseqüência, o genitor e o filho compartilham apenas um haplótipo, e há uma chance de 25% de que dois irmãos herdem haplótipos compatíveis de HLA. Como a aceitação de tecidos transplantados se correlaciona muito com o grau de similaridade entre os haplótipos de HLA (e o grupo sanguíneo ABO) do doador e do receptor, o melhor doador de medula óssea ou transplante de órgão é um irmão ABO compatível e HLA idêntico ao do receptor.

QUADRO 14–1

Variação de Proteína e DNA em Loci de HLA

Locus de HLA	Variantes Antígenos	Variantes DNA
HLA-A	25	83
HLA-B	53	186
HLA-C	11	42
HLA-DR (apenas cadeia β)	20	221
HLA-DQ (cadeias α e β)	9	49
HLA-DP (cadeias α e β)	6	88

Existe uma variação considerável no perfil e na freqüência de variantes de HLA entre diferentes populações. O HLA-A2, por exemplo, está entre as especificidades mais freqüentes de *HLA-A* em todas as populações, enquanto o HLA-A24 é encontrado em caucasianos, mas não em afro-americanos ou asiáticos. Os haplótipos de HLA também mostram um grande desequilíbrio de ligação. Alguns haplótipos são muito mais freqüentes que o esperado, enquanto outros são excepcionalmente raros, e a maioria das 3×10^7 combinações fenotípicas teoricamente possíveis entre os caucasianos nunca foram observadas. Às vezes a procura de um doador compatível de medula óssea não é bem-sucedida, a despeito de uma ampla pesquisa. Além da distribuição étnica de alelos únicos de HLA, também há uma marcante distribuição étnica de haplótipos.

HLA e Associação a Doenças

Com o crescente delineamento dos alelos de HLA sobreveio uma avaliação da associação entre algumas doenças e os antígenos de HLA ou haplótipos específicos. A base etiológica da maioria das associações HLA-doença permanece obscura. Como é aparente no Quadro 14 2, a maioria destes distúrbios, mas não todos, é **auto-imune**, isto é, associada a uma resposta imune anor-

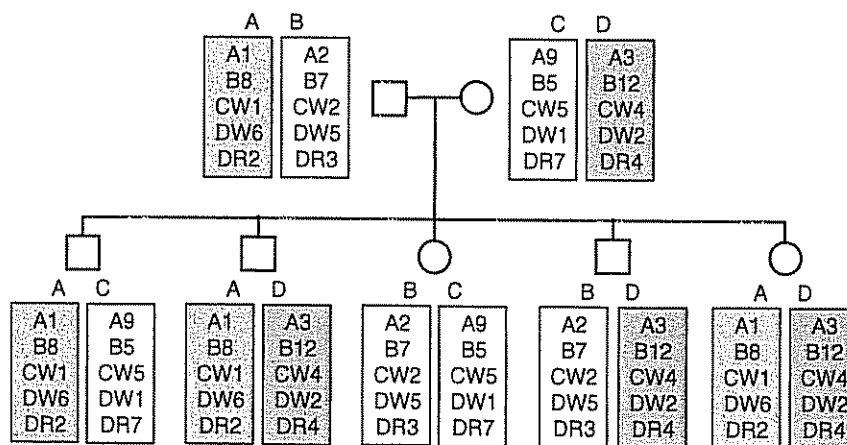



Fig. 14.3 A herança de haplótipos de HLA. Em geral um haplótipo é transmitido, como mostra a figura, como uma unidade. Em casos extremamente raros, um genitor transmitirá um haplótipo recombinante ao filho.

mal aparentemente dirigida contra um ou mais auto-antígenos que são tidos como relacionados à variação na resposta imune resultante de polimorfismo nos genes de resposta imune. Por exemplo, há uma associação muito forte entre o HLA-B27 e a **espondilite anquilosante**, uma doença inflamatória crônica da coluna e das articulações sacroilíacas. Enquanto apenas 9% dos noruegueses, por exemplo, são B27 positivos, mais de 95% daqueles com espondilite anquilosante são B27 positivos. Assim, o risco relativo de desenvolver espondilite anquilosante é pelo menos 150 vezes maior para as pessoas que têm HLA-B27 do que para aquelas que não têm. Mesmo assim, menos de 5% dos indivíduos B27 positivos desenvolvem a doença, embora até 20% das pessoas B27 positivas possam ter manifestações subclínicas muito sutis desta doença, sem sintomas de incapacitação. De modo similar, a **síndrome de Reiter**, uma condição que se assemelha muito à espondilite anquilosante, é fortemente associada ao antígeno B27.

Em outros casos, a associação entre um determinado alelo de HLA ou haplótipo e uma doença não se deve à variação nos genes de resposta imune, mas sim a um desequilíbrio de ligação entre alguns alelos de MHC e mutações em genes proximamente ligados situados dentro do complexo MHC. Por exemplo, os distúrbios autossômicos recessivos hiperplasia adrenal congênita decorrente de deficiência de 21-hidroxilase e hemocromatose primária resultam de mutações em genes que ficam dentro do MHC. A análise das várias mutações de 21-hidroxilase responsáveis pela hiperplasia adrenal revelaram que diferentes mutações neste locus ocorreram originalmente em diferentes constituições haplotípicas e permaneceram em desequilíbrio de ligação com estes marcadores específicos de haplótipos. A hemocromatose é um distúrbio autossômicos recessivo comum de sobrecarga de ferro que se comprovou fortemente associado ao alelo HLA-A3. Mais de 80% dos pacientes com hemocromatose são homozigotos para uma mutação comum no gene de hemocromatose (*HFE*) que está situado perto do *HLA-A* (ver Fig. 14.1) e está em forte desequilíbrio de ligação com o alelo HLA-A3. *HFE* não codifica uma resposta imune ou a proteína MHC classe I. Em vez disso, ela parece estar envolvida com o transporte de ferro ou o metabolismo no intestino.

Finalmente, ainda em outros casos, não está claro se um determinado haplótipo de HLA está associado a uma doença devido à variação na resposta imune ou devido a um simples desequilíbrio de ligação (porque o gene da doença não envolvido na resposta imune está incluído no complexo HLA). Por exemplo, uma das mais fortes associações HLA-doença conhecidas é aquela entre a **narcolepsia** e HLA-DQ6. Quase 100% dos pacientes noruegueses com narcolepsia expressam este antígeno classe II, em comparação com apenas cerca de 33% dos controles saudáveis. Entretanto, apenas uma pequena porcentagem de pessoas com HLA-DQ6 desenvolve narcolepsia, e os riscos de narcolepsia nestas pessoas, se comparado com as que não têm HLA-DQ6, é de apenas cerca de 40 (ver nota de rodapé no Quadro 14.2).

Muito embora a base da maioria das associações HLA-doença seja desconhecida, a evidência atual sugere que os genes de HLA não são os únicos responsáveis por doenças específicas, mas podem simplesmente contribuir, ao lado de outros fatores genéticos ou ambientais, para a predisposição à doença. Como as moléculas de HLA são integrais ao reconhecimento do antígeno por células T, acredita-se que seu papel na patogenia da doença possa estar relacionado a diferenças na capacidade destas proteínas polimórficas interagirem com o antígeno e o receptor de células T na iniciação da resposta imune (ver Fig. 14.2). Esta hipótese, que implica um papel patogênico direto para a molécula de HLA, é apoiado pela observação, descrita com alguns detalhes no Cap. 15, de que a associação entre HLA-DQ e a diabetes melito insulino-dependente está relacionada a uma única mudança de aminoácidos em um dos domínios externos da cadeia β de HLA-DQ. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual esta substituição confere a suscetibilidade à doença ainda é desconhecido.

QUADRO 14-2

Alelos HLA com Marcantes Associações a Doenças

Doença	Alelo de HLA	*Freqüência (%) Pacientes	Controles	†Risco
Espondilite anquilosante	B27	> 95	9	> 150
Síndrome de Reiter	B27	> 80	9	> 40
Uveíte anterior aguda	B27	68	9	> 20
Tireoidite subaguda	B35	70	14	14
Psoríase vulgar	Cw6	87	33	7
Narcolepsia	DQ6	> 95	33	> 38
Doença de Grave	DR3	65	27	4
Artrite reumatóide	DR4	81	33	9
Artrite reumatóide juvenil	DR8	38	7	8
Doença celíaca	DQ2	99	28	> 250
Esclerose múltipla	DR2, DQ6	86	33	12
Diabetes insulino-dependente	DQ8	81	23	14
Diabetes insulino-dependente	DQ6	< 1	33	0,02
Hemocromatose	A3	75	13	20
Hiperplasia adrenal congênita (deficiência de 21-OH)	Bw47	25	0,2	80-150

*Os dados de freqüência são de populações norueguesas e são aproximados. †O risco é aproximado e calculado como ad/bc, em que a = n.º de pacientes com o antígeno, b = n.º de controles com o antígeno, c = n.º de pacientes sem o antígeno, d = n.º de controles sem o antígeno. Adaptado de Fugger L., Tisch R., Libau R., *et al* (1995) The role of human major histocompatibility complex (HLA) genes in disease. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7.ª ed. McGraw-Hill, New York, pp. 555-585, e Bell J. I., Todd J. A., McDevitt H. O. (1989). The molecular basis of HLA-disease association. Adv Hum Genet 18:1-41 e adaptado com permissão de Elsevier Science, de Thorsby E. (1997) HLA associated diseases. Hum Immunol 53:1-11, copyright 1997 de American Society of Histocompatibility and Immunogenetics

IMUNOGLOBULINAS

Anticorpos são imunoglobulinas que surgem em resposta a um estímulo por um antígeno exógeno e podem reconhecer e se ligar a este antígeno, facilitando sua eliminação. Elas são mediadoras da resposta imune nas doenças relacionadas aos HLA que descrevemos, bem como da resposta aos antígenos exógenos. Várias doenças genéticas são decorrentes de deficiências de imunoglobulinas. Entretanto, o significado primário das imunoglobulinas na perspectiva da genética é que exibe uma propriedade única, o **rearranjo somático**, pelo qual o corte e a reunião de seqüências de DNA nas células precursoras de linfócitos é usado para rearranjar genes nas células somáticas e gerar diversidade.

Os anticorpos existem em duas formas: uma forma ligada à membrana, nos linfócitos B, e uma forma solúvel ou secretada. Os anticorpos secretados são produzidos pelas células do plasma, que são derivadas dos linfócitos B por proliferação e maturação. Este processo, conhecido como ativação das células B, é iniciado pela interação de um agente específico e uma molécula adequada de anticorpo na membrana da célula B. Tal interação resulta na expansão clonal e na diferenciação da célula B, com a conseqüente formação de plasmócitos, que secretam anticorpos específicos para ativar antígenos e células B de memória capazes de responder pronta e fortemente a uma posterior invasão do mesmo antígeno.

Estrutura e Diversidade das Imunoglobulinas

Um dos aspectos mais fascinantes da imunogenética é o mecanismo pelo qual um número aparentemente infinito de diferentes anticorpos pode ser codificado no DNA da linhagem germinativa de qualquer pessoa. Estima-se que cada ser humano pode gerar um repertório de cerca de 10^{11} anticorpos diferentes, embora o genoma seja composto de apenas 6×10^9 pares de bases de DNA. Esta aparente disparidade foi esclarecida pela demonstração de que os anticorpos são codificados na linhagem germinativa por um número relativamente pequeno de genes que, durante o desenvolvimento das células B, sofrem um processo único de rearranjo somático e mutação somática que permite a geração da enorme diversidade. O potencial para criar tais números enormes de anticorpos diferentes parece ter evoluído como um mecanismo para a proteção contra a enorme gama de organismos ambientais infecciosos, agentes tóxicos e células malignas autólogas às quais uma pessoa pode ser exposta.

As moléculas de imunoglobulina são compostas de quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) idênticas e duas cadeias leves (L) idênticas, que são mantidas juntas por pontes dissulfídricas intercatenares (Fig. 14.4). As pontes dissulfídricas intracatenares subdividem cada cadeia em uma série de domínios homólogos. Com base nas diferenças estruturais na parte terminal carboxila, as cadeias H são subdivididas em cinco classes ou isotipos, γ, α, μ, δ, e ε, e as imunoglobulinas correspondentes são designadas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Como indica o Quadro 14.3, as diferentes classes de imunoglobulinas diferem tanto funcional como estruturalmente. As cadeias L de moléculas de imunoglobulinas também podem ser de dois tipos, κ e λ, mas não ambas do mesmo anticorpo. Portanto, o anticorpo produzido por uma única célula B contém apenas um único isotipo da cadeia H e um único subtipo da cadeia L, um fenômeno conhecido como **exclusão isotípica**. Além disso, ao contrário da

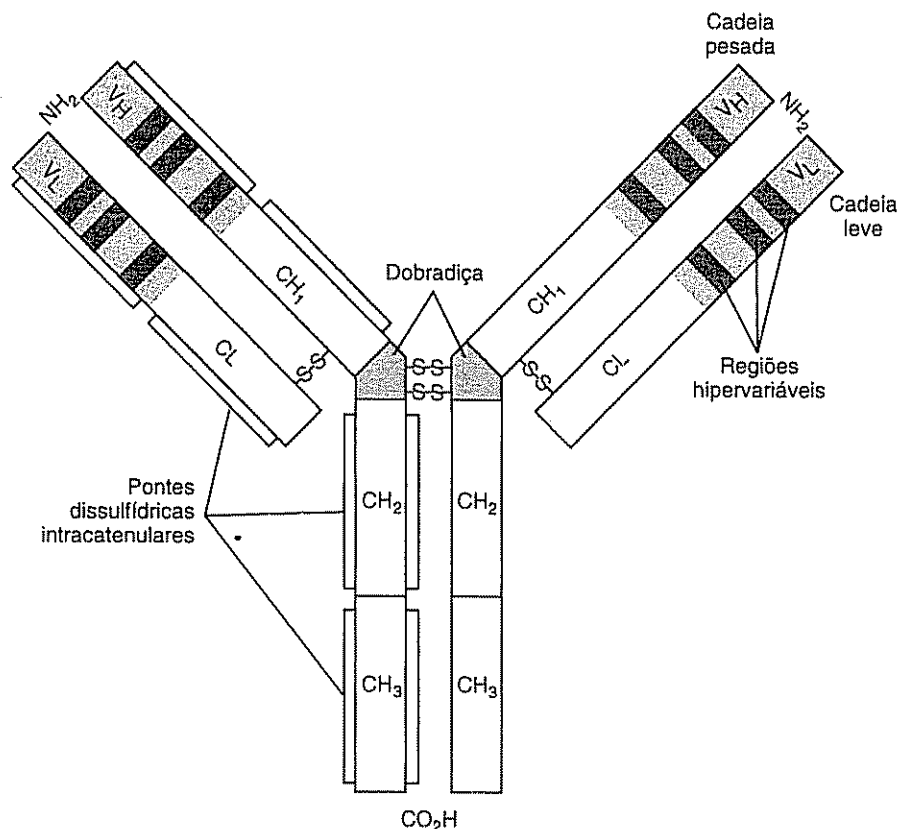



Fig. 14.4 Estrutura básica de uma molécula de imunoglobulina, consistindo em duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Cada cadeia consiste em uma região variável (V) e uma região constante (C). NH_2 = aminoterminal. CO_2H = carboxiterminal.

QUADRO 14-3

Criação de Diversidade Primária de Anticorpos em Humanos

Genes da Linhagem Germinativa	H	κ	λ
V	200	100	100
J	6	5	6
D	20	—	—
Rearranjo somático V × J (×D)	$2,4 \times 10^4$	500	600
Dimerização de cadeia H-L			
H × κ	$1,2 \times 10^7$		
H × λ	$1,4 \times 10^7$		
Repertório potencial total com diversidade juncional	$\sim 10^{11}$		

Os números de segmentos gênicos e de contribuição da diversidade juncional são estimados. As mutações somáticas aumentam mais o grau de diversidade nas respostas secundárias a antígenos.

maioria dos outros loci autossômicos (com exceção dos loci imprintados; ver Cap. 5), apenas um dos pares de alelos parentais para cada cadeia H e cadeia L é expresso dentro de uma única célula: seja o alelo paterno ou materno, mas não ambos. A expressão restrita a apenas um dos dois alelos, **exclusão alélica**, ainda não é totalmente compreendida.

Cada cadeia H e L de uma proteína imunoglobulina consiste em dois segmentos, as regiões constante (C) e variável (V) (ver Fig. 14.14). A região constante, que determina a classe de moléculas de imunoglobulina, está situada no terminal carboxila e sua seqüência amino é relativamente conservada entre as imunoglobulinas da mesma classe. Em contraste, a região V está situada no terminal amino e sua seqüência de aminoácidos mostra ampla variação entre anticorpos diferentes. As regiões V das cadeias H e L formam o sítio de ligação do antígeno e determinam a especificidade do anticorpo.

Os genes codificantes das cadeias H (todos os cinco isotipos) e as cadeias L κ e λ estão situados em três regiões cromossômicas não-ligadas (Fig. 14.5). Os genes da cadeia L κ estão no cromossomo 2 na banda 2p13, os genes da cadeia L λ estão no cromossomo 22 na banda 22q11 e os genes da cadeia H para todos os cinco isotipos estão no cromossomo 14 na banda 14q32. Cada cadeia H e L é codificada por múltiplos genes que estão bastante separados por centenas de kb *no DNA da linhagem germinativa*. O locus da cadeia L κ contém aproximadamente 100 genes V individuais, cinco segmentos de junção (J) e um único gene de domínio constante. O locus da cadeia L λ contém um número similar de genes V individuais e segmentos de junção (J), mas tem seis genes capazes de codificar o domínio constante da cadeia leve. A região V da cadeia H é constituída de três domínios: os segmentos V e J e uma terceira unidade, o segmento de diversidade (D) (ver Fig. 14.5). Mais de 200 genes diferentes de segmento V estão presentes no locus da cadeia H. Mais adiante no cromossomo estão cerca de 20 genes de segmento D e seis genes do segmento J, seguidos de vários genes do segmento constante para cada um dos isotipos de imunoglobulina. No total, cada grupo de genes de imunoglobulina possui muitos milhões de pares de bases.

Durante a diferenciação das células produtoras de anticorpo, mas não de outras linhagens celulares, o DNA nos loci de imunoglobulina sofre **rearranjo somático** catalisado por **recombinases**. Como mostra esquematicamente a Fig. 14.6, uma recom-

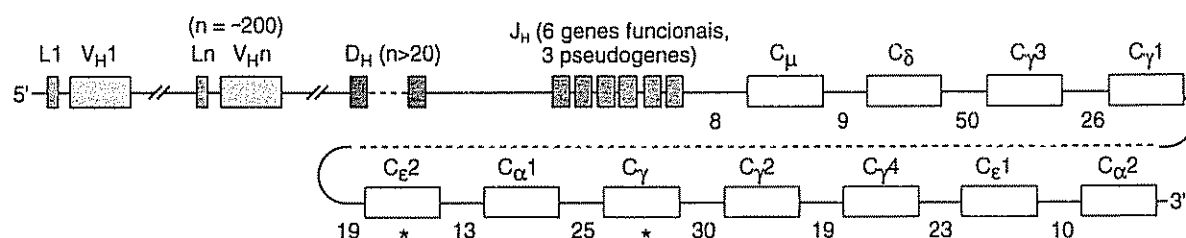
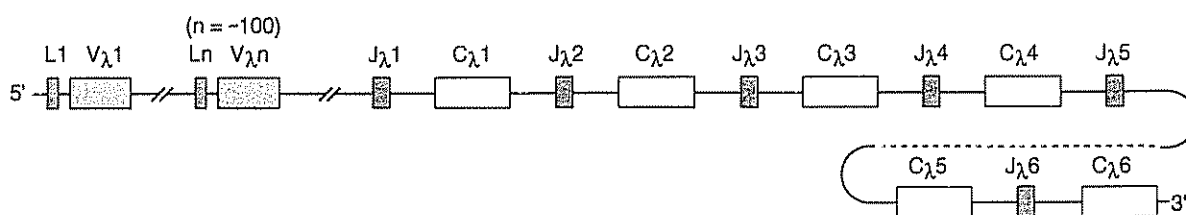



Fig. 14.5 Estrutura dos grupamentos gênicos de imunoglobulina. As regiões codificantes e não-codificantes não estão em escala. Os asteriscos indicam pseudogenes. O número exato de genes e o tamanho geral dos grupos gênicos não são mostrados. (Reproduzida com permissão de Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. [1997] Cellular and Molecular Immunology. 3.ª ed. WB Saunders, Philadelphia.)

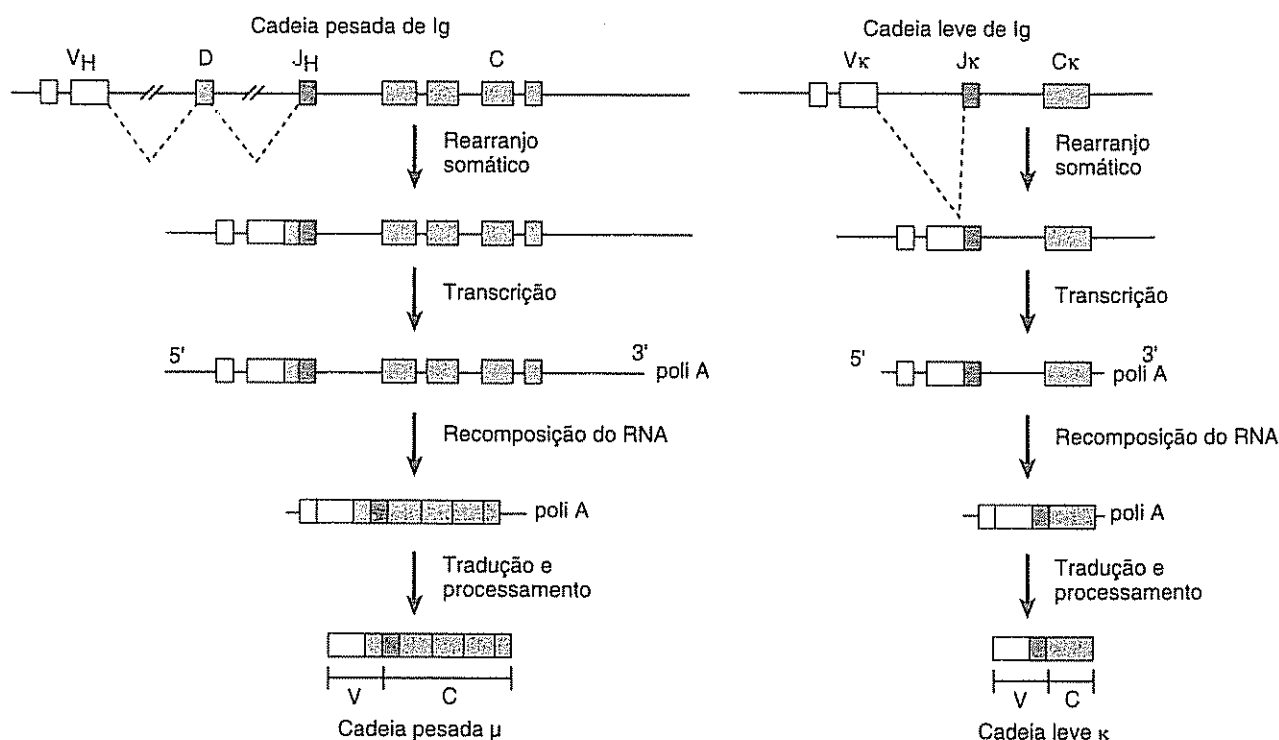



Fig. 14.6 Esquema dos rearranjos dos genes de imunoglobulinas de cadeias pesadas e leves na formação de anticorpos

binase cria um gene completo de região variável pela geração de quebras bifilamentares no DNA no locus de cadeia L e pela religação das pontas livres de DNA, o que resulta na justaposição de um dos cerca de 100 segmentos V_κ a uma das regiões J_κ e deleção do DNA intercalar. Este segmento rearranjado é então transcrito, e as seqüências íntron entre J_κ e C_κ são removidas, como usualmente, por recomposição do RNA, para gerar um RNA final (mRNA) para tradução em uma cadeia leve κ específica. A cadeia leve λ sofre um processo similar de rearranjo de DNA antes da transcrição, mas tem uma organização um pouco diferente na linhagem germinativa. Cada segmento J está associado a um dentre seis segmentos C_λ diferentes (ver Figs. 14.5 e 14.6). De modo similar, para as cadeias pesadas, um segmento D e um segmento J são justapostos e então fundidos a um segmento V por rearranjo somático catalisado por recombinases. O uso adicional de um dos múltiplos segmentos D na formação da região variável de cadeia H gera uma diversidade ainda maior na região variável de cadeia H (ver Fig. 14.5).

Outra fonte de diversidade de anticorpo é gerada por deleções causadas pela união imprecisa dos segmentos gênicos V e J (cadeia L) ou segmentos V, D e J (cadeia H) durante o processo de rearranjo do DNA. As inserções no sítio de união também podem ocorrer quando são inseridos nucleotídeos (chamados de seqüências N que são adicionadas por uma transferase terminal que não estão presentes no DNA da linhagem germinativa original) no sítio de religação. A perda ou o ganho de alguns nucleotídeos produz mudanças de matriz de leitura que codificam aminoácidos diferentes no gene final recomposto.

As possibilidades de diversificação fornecidas pelo pareamento diferente das cadeias H e L e pelos rearranjos de DNA que unem diferentes segmentos gênicos V, D e J da linhagem germinativa ocorrem durante o desenvolvimento das células B, antes de qualquer estimulação antigênica. Elas criam o repertório básico de anticorpos que as células B são capazes de produzir. Entretanto, uma vez que ocorra a estimulação antigênica, as células B que produzem anticorpos com alguma afinidade pelo antígeno são estimuladas e sofrem freqüentes mutações de ponto dentro das seqüências codificantes rearranjadas VJ ou VDJ. Esta taxa de mutação espontânea (uma mutação por 10^3 pares de bases de DNA por divisão celular) é muito alta, de 100 a 1.000 vezes maior que a taxa de mutação média em outra parte do genoma. Estas mutações espontâneas mudam a seqüência de aminoácidos dentro do domínio variável (reconhecimento de antígeno) das moléculas de anticorpo e são um mecanismo de "ajuste fino" para melhorar a afinidade de um anticorpo por meio de um mecanismo de *feedback*. Se uma mutação dentro de uma célula B aumentar a afinidade de uma molécula de anticorpo por um antígeno, esta célula B receberá um estímulo adicional e ampliará sua produção do anticorpo melhorado. A mutação somática fornece outro mecanismo importante para a maior expansão do repertório potencial de especificidades de anticorpo.

A diversidade de anticorpo é, portanto, gerada por vários mecanismos moleculares, inclusive os seguintes:

1. A possibilidade de pareamento entre quaisquer dos isotipos da cadeia H e subtipos da cadeia L.
2. A disponibilidade de genes V, D e J diferentes.
3. Diversidade juncional, criada pela união imprecisa e pela inserção aleatória de nucleotídeos entre os elementos recombinantes V e D ou os elementos D e J.
4. Taxas elevadas de mutação somática dentro de segmentos da região V para aumentar a afinidade de um anticorpo por seu antígeno.

Como mostra o Quadro 14.3, a diversidade molecular em anticorpos gerada por todos estes mecanismos é verdadeiramente incrível e permite que os humanos respondam a uma ampla gama de antígenos.

O RECEPTOR DE ANTÍGENO DE CÉLULA T

O mecanismo de geração de diversidade característico das imunoglobulinas é compartilhado com outro membro da superfamília de genes de imunoglobulina, o TCR. O TCR representa o análogo de célula T da imunoglobulina ligada à membrana nas células B (ver Fig. 14.2). O receptor é uma glicoproteína heterodimérica transmembranar que tem um papel importante no reconhecimento do antígeno e na origem da atividade citotóxica ou célula T *helper*. Ao contrário da imunoglobulina, o TCR não tem forma solúvel. O TCR assemelha-se estruturalmente à molécula de imunoglobulina. Todas as cadeias têm tanto trechos constantes quanto variáveis, sendo os trechos variáveis gerados por uma combinação de segmentos V, D e J. Assim, os genes de TCR, que são codificados em três regiões separadas (Fig. 14.7), parecem ser membros da superfamília de genes de imunoglobulina, compartilhando a ancestralidade com os genes de imunoglobulina.

Uma diferença significativa entre os anticorpos e o TCR é o papel pré-requisito das moléculas de MHC no reconhecimento do antígeno pelas células T. O receptor das células T não pode reconhecer um antígeno, a menos que o antígeno seja apresentado como um peptídeo processado em complexo com uma molécula de MHC classe I ou classe II (ver Fig. 14.2). Assim, o receptor de células T nas células de uma pessoa é específico para a combinação de peptídeo antigênico e os antígenos MHC de superfície do próprio indivíduo, um fenômeno conhecido como **restrição de MHC**.

Do mesmo modo que há uma sucessão ordenada de expressão das hemoglobinas embrionária, fetal e adulta durante o desenvolvimento (ver Cap. 11), diferentes receptores de células T são expressos durante o desenvolvimento. Durante o desenvolvimento inicial de células T no timo, por volta de 9 semanas de gestação nos seres humanos, os precursores de células T expressam heterodímeros das cadeias γ e δ de TCR. Os TCRs $\gamma\delta$ são tidos como importantes para gerar autotolerância dentro do sistema imune por permitirem a seleção *contra* as células que reagem ao "próprio". Em uma ou duas semanas, a expressão de $\gamma\delta$ diminui para níveis muito mais baixos, e surgem células T maduras portando heterodímeros das cadeias α e β em sua superfície.

Como nos genes de imunoglobulina, a recombinação de múltiplos elementos da linhagem germinativa, a imprecisão da união e a possibilidade de várias combinações de cadeia criam uma ampla diversidade nos genes TCR. Ao contrário das imunoglobulinas, entretanto, a origem dos TCRs não envolve mutação somática. Mesmo sem a mutação somática gerar diversidade, há uma diversidade juncional muito maior nos genes TCR em função da inserção de nucleotídeos extras nas junções VJ e VDJ. Por este mecanismo, são gerados níveis de diversidade nos genes TCR. Segundo as estimativas, são possíveis 10^{16} diferentes receptores $\alpha\beta$ e 10^{18} diferentes receptores $\gamma\delta$ de célula T.

O rearranjo somático que ocorre durante o desenvolvimento das células B e T, juntamente com a alta taxa de mutação somática nas células B respondendo a um antígeno, só ocorre nos grupos gênicos de imunoglobulina e TCR nas linhagens B e T, respectivamente. Tal comportamento é único para estas famílias de genes e linhagens celulares e torna o sistema imune um assunto fascinante de estudo da estrutura gênica expressão gênica, e desenvolvimento

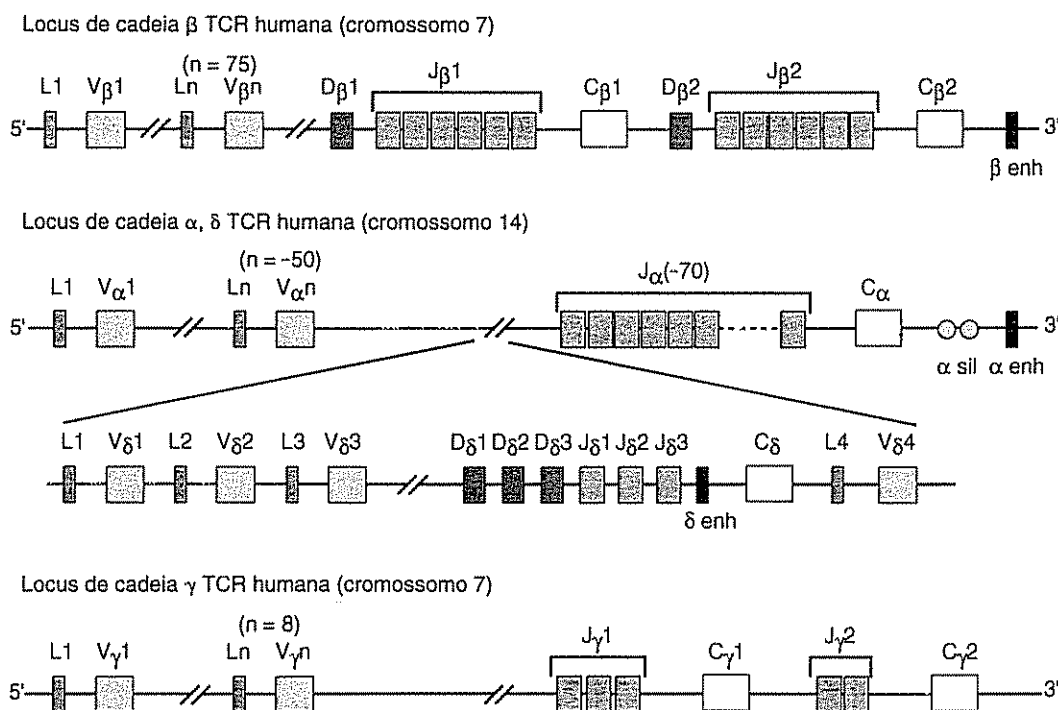



Fig. 14.7 Rearranjos da linhagem germinativa dos genes humanos *TCR*. Os tamanhos dos éxons e íntrons não estão em escala. O grupamento gênico da cadeia β consiste em 75 segmentos gênicos variáveis (V) e dois conjuntos de segmentos gênicos de diversidade (D), junção (J) e constantes. O grupo gênico da cadeia α contém cerca de 50 segmentos gênicos V, 70 segmentos gênicos J e um único gene de segmento C. O grupamento gênico da cadeia γ tem cerca de 8 segmentos V, juntamente com dois conjuntos de segmentos gênicos J e C. O grupamento gênico da cadeia δ está embutido no grupamento α no cromossomo 14. As seqüências chamadas de acentuador (enh) e silenciador (sil) estão envolvidas no controle da expressão gênica aumentando ou desligando a transcrição, respectivamente. (Reproduzida com permissão de Abbas A. K., Lichtman A. H., Prober J. S. [1997] Cellular and Molecular Immunology, 3.ª ed. WB Saunders, Philadelphia.)

QUADRO 14–4

Doenças Genéticas de Imunodeficiência

Categoria	Designação	N.º de Células T	N.º de Células B	Níveis de Ig	Patogenia do Defeito Genético	Locus Genético
Defeitos combinados de linfócitos T e B	Imunodeficiência combinada grave (SCID) ligada ao X	Baixo	Normal a alto	Baixo	Defeito de cadeia γ de receptor IL-2 e receptores para outras citocinas, IL-4, 7, 9, 15	*IL2RG (SCIDX1)* Xq 13.1
	Deficiência de JAK3	Baixo	Normal a alto	Baixo	Defeito de cinase sinalizadora intracelular *JAK3*	*JAK3* 19p 13.1
	Deficiência de adenosina (ADA)	Diminuição progressiva	Diminuição progressiva	Baixo	Toxidez seletiva de linfócitos da via de intermediários de purina	*ADA* 20q 13.11
	Deficiência de fosforilase de nucleosídeos purina (PNP)	Diminuição progressiva	Normal	Normal ou baixo	Toxidez de linfócito de intermediários da via de purinas	*PNP* 14q13
	Deficiência de MHC classe II	Baixo CD4	Normal	Normal ou baixo	Mutação em fatores que controlam a expressão do gene *MHCII*	*CIITA* 16q13 *RFX5* 1q
	Deficiência de cinase ZAP 70	Baixo CD8	Normal	Normal	Defeito de cinase intracelular de timócito; maturação bloqueada de células T	*ZAP70* 2q12
	Deficiência do gene de ativação de recombinase (*RAG1, RAG2*)	Baixo	Ausente	Ausente	Sem rearranjo de receptor de células T ou B; desenvolvimento bloqueado de linfócitos	*RAG1, RAG2* 11p13
	Síndrome de Omenn	Baixo	Baixo	Baixo	Rearranjo defeituoso de receptor de células T ou B	*RAG1, RAG2*
	Síndrome hiper IgM ligada ao X	Normal	Normal	IgM normal a alta; IgA, IgG baixas	Defeito de ligando *CD40*, expresso em células T; bloqueio na mudança de isotipo de célula B	*HIGMX* Xq25-q26
	Síndrome de DiGeorge	Normal a baixo	Normal	Normal a baixo	Defeito embriológico do desenvolvimento tímico; defeitos associados variáveis do coração, paratireóide, face	22q11.2 e outros loci
Deficiências de anticorpo	Agamaglobulinemia ligada ao X	Normal	Muito baixo a ausente	Baixo a ausente	Defeito de célula B, específico de tirosina cinase de Bruton (BTK)	*XLA* Xq22
	Deficiência de cadeia pesada μ	Normal	Ausente	Ausente	Defeito de expressão de cadeia μ na superfície celular	*IGHμ* 14q32.3

continua

QUADRO 14–4

Doenças Genéticas de Imunodeficiência (*Continuação*)

Categoria	Designação	N.º de Células T	N.º de Células B	Níveis de Ig	Patogenia do Defeito Genético	Locus Genético
Outras síndromes distintas com defeitos imunes	Síndrome de Wiskott-Aldrich	Normal a baixo	Normal	Normal (IgM um pouco baixo)	Defeito do gene *WASP* envolvido no citoesqueleto; plaquetas pequenas e esparsas; eczema	*WASP* Xp11.23
	Ataxia telangiectasia	Normal	Normal	Normal	Defeito de reparo no DNA no gene *ATM*; ataxia, neurodegeneração progressiva; câncer; sensibilidade à radiação	*ATM* 11q22-q23
	Síndrome de Bloom	Normal	Normal	Normal	Defeito de reparo no DNA no gene *BLM*; neurodegeneração progressiva; câncer; sensibilidade à radiação	*BLM* 15q26.1
	Síndrome auto-imune linfoproliferativa	Normal a alto; elevados CD4/CD8-Células T	Alto	Alto	Apoptose Fas-mediada prejudicada de células B e T; linfadenopatia: auto-imunidade	*FAS* 10q24
Distúrbios de fagócito	Doença granulomatosa crônica (CGD)	Normal	Normal	Normal	Destruição prejudicada de organismos ingeridos decorrente de defeitos em 4 genes codificantes de enzimas do sistema citocromo oxidase	*CYBB* ($gp91^{phox}$), Xp21.1 *CYBA* (22^{phox}), 16q24.1 *NCF1* ($p47^{phox}$), 7q11.23 *NCF2* ($p67^{phox}$), 1q25
	Deficiência de adesão leucocitária (LAD)	Normal	Normal	Normal	Defeitos de CD18 ou outras proteínas de superfície leucocitária necessárias à motilidade, aderência e endocitose	*CD18* 21q22.3
	Síndrome de Chediak-Higashi	Normal	Normal	Normal	Defeito no gene *CHS1* causando lisossomos defeituosos, grânulos citoplasmáticos gigantes	*CHS1*, 1q42-q44
Distúrbios do complemento	Deficiências individuais de componente	Normal	Normal	Normal	Deficiências de C1, C2, C4, C3 associadas a infecções auto-imunes e piogênicas; deficiências de C3, C5-9 e deficiências de properdina com infecções neisseriais	Muitos

DISTÚRBIOS MONOGÊNICOS DO SISTEMA IMUNE

Com um sistema tão complexo como o sistema imune, não surpreende que um grande número de defeitos genéticos possa ocorrer para produzir fenótipos altamente pleiotrópicos de gravidade variável. Um grande número e uma grande variedade de distúrbios monogênicos do sistema imune foram descritos, e um número crescente de genes responsáveis foi identificado (ver exemplos no Quadro 14.4). Alguns genes de imunodeficiência estão envolvidos nas vias de sinalização celular envolvidas na maturação de linfócitos. Um exemplo é o gene codificante de uma subunidade (γ) do receptor para interleucina-2, um fator de crescimento de célula T. As mutações neste gene são responsáveis pela forma ligada ao X da **imunodeficiência combinada grave**. Outro exemplo são os genes (*RAG1* e *RAG2*) que codificam as recombinases responsáveis pelos rearranjos de DNA somáticos que ocorrem durante o desenvolvimento das células T e células B. A perda total de função de um destes genes causa uma imunodeficiência combinada grave, enquanto alelos mutantes menos deletérios causam a **síndrome de Omenn**. Outras causas de imunodeficiência resultam de deficiências enzimáticas que prejudicam o funcionamento celular, tais como a fagocitose defeituosa na deficiência de citocromo oxidase, ou a morte bacteriana defeituosa mediada por complemento devida a deficiências de complemento.

O isolamento dos genes subjacentes a vários distúrbios primários de imunodeficiência também possibilitam seu tratamento potencial por terapia gênica de célula somática. As doenças de imunodeficiência são candidatas particularmente apropriadas a este enfoque terapêutico, tanto em função de sua considerável morbidade e mortalidade como porque os defeitos subjacentes a fenótipos anormais são amplamente restritos a células hematopoéticas e podem, portanto, ser corrigidos pela introdução de um gene normal nas células da medula óssea do paciente, como uma reposição. Como descrito no Cap. 13, uma forma recessiva ligada ao X de imunodeficiência combinada grave foi a primeira doença de imunodeficiência humana tratada de modo bem-sucedido por terapia gênica somática.

Referências Gerais

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1997) Cellular and Molecular Immunology, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia.

Ochs HD, Smith E, Puck JM (1998) Primary Immunodeficiency Disease: A Molecular and Genetic Approach. Oxford University Press, Oxford, England.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Bell JI, Todd JA, McDevitt HO (1989) The molecular basis of HLA-disease association. Adv Hum Genet 18:1–41.

Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al (1997) Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. Hum Immunol 53:98–128

Fugger L, Tisch R, Libau R, et al (1995) The role of human major histocompatibility complex (HLA) genes in disease. *In* Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 7th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 555–585.

Puck JM (1997) Primary immunodeficiency diseases. JAMA 278:1835–1841.

deVries RRP, van Rood JJ (1992) Immunogenetics and disease. *In* RA King, JL Rotter, AG Motulsky (eds) The Genetic Basis of Common Diseases. Oxford University Press, New York, pp. 92–114.

Problemas

1. A espondilite anquilosante e o HLA-B27 estão fortemente *associados*. O locus de *HLA-B* e o locus para 21-hidroxilase (mutações que levam à hiperplasia adrenal congênita) estão fortemente *ligados*. Distinga estes dois conceitos.

2. Arrume os seguintes membros familiares em ordem de sua probabilidade de compartilhar dois haplótipos de HLA com o receptor e, assim, serem doadores compatíveis de tecidos ou órgãos: irmão, pai, gêmeo monozigótico, gêmeo dizigótico, meio-irmão, mãe, pessoa não-aparentada, primo em primeiro grau. Por que um gêmeo monozigótico de um receptor não é necessariamente o doador de escolha?

3. Como o rearranjo somático de genes de imunoglobulina e receptor de células T diferem da remoção de íntrons e recomposição de éxons que é característica da maioria dos genes?

4. Como a expressão de genes de imunoglobulina difere da expressão da maioria dos outros loci autossômicos?

5. Para algumas imunodeficiências ligadas ao X, tais como a síndrome de Wiskott-Aldrich, a agamaglobulinemia e a imunodeficiência combinada grave (SCID), algumas populações de células em mulheres portadoras mostram uma inativação não-aleatória do X. Isto é, todas as células contêm o X com o alelo normal ativo, ao contrário de outros tecidos, que mostram inativação aleatória do X na mesma mulher. A população de células afetadas é característica de cada distúrbio; isto é, as células B na agamaglobulinemia, as células B e T na SCID e as células T na síndrome de Wiskott-Aldrich. Explique. Você esperaria encontrar inativação aleatória ou não-aleatória do X nas células de portadoras de formas autossômicas de imunodeficiência?

15

Genética dos Distúrbios com Herança Complexa

A hereditariedade contribui para as doenças humanas mais comuns. Doenças tais como os defeitos congênitos de nascimento, o infarto do miocárdio (MI), o câncer, a doença mental, a diabetes e a doença de Alzheimer (AD) causam morbidade e mortalidade prematura em quase duas em cada três pessoas durante a vida (Quadro 15.1). Embora estas doenças possam ser causadas por uma mutação em um gene único em algumas famílias, elas em geral não são distúrbios monogênicos. Estes distúrbios resultam de interações complexas de vários fatores de predisposição, incluindo o genótipo em um ou mais loci e uma variedade de exposições ambientais que ativam, aceleram ou exacerbam o processo da doença. Nesta situação, a ocorrência da doença em famílias não se ajusta a um dos padrões mendelianos simples de herança e diz-se que segue um padrão de herança **complexa** ou **multifatorial**.

Uma doença genética que está presente ou ausente é chamada de característica **distinta** ou **qualitativa**. A pessoa tem ou não tem a característica. Em contraste, existem as características **quantitativas**, que são características mensuráveis (quantidades fisiológicas ou bioquímicas), tais como altura, pressão sanguínea, colesterol sérico e índice de massa corpórea (peso em quilos dividido pelo quadrado da altura em metros, como medida de obesidade). A base genética para a variabilidade das características quantitativas é central para se compreender como os genes contribuem para muitas doenças comuns e devastadoras na população.

Neste capítulo, abordaremos a questão de como se determina a contribuição dos genes para as doenças comuns e a variabilidade das características fisiológicas. Descreveremos estudos de gêmeos e métodos de controle — casos usados pelos geneticistas para determinar as contribuições relativas dos genes e do ambiente para características qualitativas e quantitativas. Explicaremos, então, os métodos usados para avaliar quantos genes, se é que algum, contribuem para o fenótipo e como a localização genômica de tais genes é determinada. Finalmente, apresentaremos vários exemplos de doenças nas quais começamos a compreender os mecanismos pelos quais os alelos em mais de um locus conferem suscetibilidade à doença ou contribuem para a variação fenotípica. O campo está se desenvolvendo rapidamente, e está claro que a base genética de muitas outras doenças humanas complexas será elucidada logo. A identificação de fatores tanto genéticos quanto ambientais que resultam em doenças comuns permitirá o desenvolvimento de medidas terapêuticas e preventivas racionais.

ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS DE DOENÇAS

Agregação Familiar da Doença

Como os parentes compartilham uma proporção maior de seus genes entre si do que com as pessoas não-aparentadas na população, uma característica primária das doenças com herança complexa é que as pessoas afetadas tendem a se agrupar nas famílias

QUADRO 15-1

Freqüência de Diferentes Tipos de Doenças Genéticas

Tipo	Incidência ao Nascimento (por 1.000)	Prevalência aos 25 Anos (por 1.000)	Prevalência Populacional (por 1.000)
Distúrbios decorrentes de mutações genômicas e cromossômicas	6	1,8	3,8
Distúrbios decorrentes de mutações monogênicas	10	3,6	20
Distúrbios decorrentes de herança multifatorial	~50	~50	~600

Dados adaptados de Rimoin D L., Connor J.M., Pyeritz R E (1997) Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3.ª ed Churchill Livingstone, Edinburgh

(agregação familiar). O contrário, entretanto, não é necessariamente verdadeiro: a agregação familiar de uma doença não significa que uma doença deva ter uma contribuição genética. Os membros familiares podem desenvolver a mesma doença ou característica apenas por acaso, em particular se ela for comum na população. Mesmo que a agregação familiar não se deva ao acaso, as famílias compartilham mais que seus genes. Por exemplo, elas em geral têm atitudes culturais e comportamentos, dieta e exposições ambientais em comum. É tarefa do epidemiologista genético determinar se a agregação familiar é coincidência ou o resultado de fatores comuns aos membros da família, bem como avaliar até que ponto estes fatores comuns são genéticos e ambientais. Por fim, os estudos de mapeamento gênico para situar e identificar os loci e alelos especificamente envolvidos fornecem a prova definitiva de uma contribuição genética para a doença multifatorial.

Concordância e Discordância

Quando dois indivíduos aparentados em uma família têm a mesma doença, eles são chamados de **concordantes** para o distúrbio. Contrariamente, quando apenas um membro do par de parentes é afetado e o outro não, eles são **discordantes** quanto à doença. As doenças com herança complexa resultam do impacto de fatores ambientais nas pessoas com determinados genótipos. A discordância para o fenótipo entre parentes que compartilham um genótipo em loci que predispõem a doenças pode ser explicada se a pessoa não-afetada não foi exposta aos outros fatores (ambientais ou ocorrências ao acaso) necessários para disparar o processo da doença e torná-la manifesta. Contrariamente, a concordância quanto a um fenótipo pode ocorrer mesmo quando os dois parentes afetados têm genótipos de predisposição diferentes, se a doença em um parente for uma **genocópia** ou **fenocópia** da doença no outro parente. A falta de penetrância e as freqüentes genocópias e fenocópias contribuem para obscurecer o padrão de herança na doença genética multifatorial.

Medida da Agregação Familiar

Risco Relativo λ_r

A agregação familiar de uma doença pode ser medida comparando-se a freqüência da doença nos parentes de um probando afetado com sua freqüência (prevalência) na população geral. A **proporção de risco relativo** λ_r é definida como

$$\lambda_r = \frac{\text{prevalência da doença em um parente "r" de um afetado}}{\text{prevalência da doença na população}}$$

(O subscrito r para λ é usado aqui genericamente; na prática, mede-se λ para uma determinada classe de parentes, p. ex., r = s para irmãos, r = p para pais.) O valor de λ_r é uma medida da agregação familiar que depende tanto do risco da doença recorrer na família quanto na prevalência populacional: quanto maior for λ_r, maior será a agregação familiar. A prevalência populacional entra no cálculo porque quanto mais comum for a doença, maior será a probabilidade de que a agregação possa ser apenas uma coincidência e não o resultado de compartilhar os alelos que predispõem à doença. Um valor de $\lambda_r = 1$ indica que um parente não tem maior probabilidade de desenvolver a doença do que qualquer pessoa na população. Os exemplos de valores de λ_r maiores que 1 para várias doenças são mostrados no Quadro 15.2.

Estudos de Controle de Casos

Outro enfoque para avaliar a agregação familiar é o **estudo de controle de casos**, no qual os pacientes com uma doença (os casos) são comparados com pessoas adequadamente escolhidas sem a doença (os controles) com relação à história familiar da doença (bem como outros fatores, tais como exposições ambientais, ocupação, localização geográfica, paridade e doenças prévias). Para avaliar uma possível contribuição genética à agregação familiar de uma doença, a freqüência com a qual a doença é encontrada nas famílias ampliadas dos casos (**história familiar positiva**) é comparada com a freqüência de história familiar positiva entre controles adequados, ajustados por idade e etnicidade, mas que não têm a doença. Os cônjuges em geral são usados como controles nesta situação porque eles normalmente são ajustados aos casos em idade e etnicidade e compartilham o mesmo ambiente familiar. Outros controles usados com freqüência são pacientes com doenças não-relacionadas ajustados por idade, ocupação e etnicidade. Assim, por exemplo, em um estudo da **doença de Parkinson** (PD), 6,3% dos parentes vivos de primeiro e segundo graus de pacientes com PD também tinham PD, uma prevalência que era significativamente maior que a prevalência de 1,2% de PD entre os parentes de controles ajustados com outras doenças neurológicas, mas não com PD. Podemos concluir, portanto, que uma história familiar de PD é encontrada com mais freqüência entre os pacientes com PD que nos controles, o que indica que alguma agregação familiar está ocorrendo na PD.

Os estudos de controle de casos para agregação familiar estão sujeitos a muitos tipos diferentes de erros. Um dos mais problemáticos é a **tendenciosidade de averiguação**, uma diferença na probabilidade de que os parentes afetados dos casos sejam

QUADRO 15–2

Riscos λ_r para Parentes de Probandos com Doenças de Agregação Familiar e Herança Complexa

Doença	Parentesco	λ_r
Esquizofrenia	Gêmeos MZ	48
	Irmãos	12
Autismo	Gêmeos MZ	2 000
	Irmãos	150
Distúrbio maníaco-depressivo (bipolar)	Gêmeos MZ	60
	Irmãos	7
Diabetes melito tipo 1	Gêmeos MZ	80
	Irmãos	12
Doença de Crohn	Gêmeos MZ	840
	Irmãos	25
Esclerose múltipla	Gêmeos MZ	800
	Irmãos	24

MZ = Monozigóticos

Dados adaptados de Rimoin D.L., Connor J.M., Pyeritz R.E. (1997) Emery e Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. 3.ª ed Churchill Livingstone. Edinburgh; King R.A., Rotter J.I., Motulsky A.G. (1992) The Genetic Basis of Common Diseases Oxford University Press. Oxford, Inglaterra.

relatados ao epidemiologista em comparação com os parentes afetados dos controles. Um parente de um probando pode ter mais probabilidade do que os parentes dos controles de conhecer os outros membros da família com a mesma doença ou pode estar mais motivado a responder a um questionário devido à familiaridade com a doença (**tendenciosidade de chamada**). Outro fator de confusão é a escolha dos controles. Os controles podem diferir dos casos apenas em sua condição de doença e não nas questões étnica, de ocupação, sexo ou condição socioeconômica, qualquer uma das quais pode distingui-los como sendo diferentes dos casos de modos importantes que têm pouco ou nada a ver com o fato de eles não serem afetados pela doença. Finalmente, uma associação encontrada em um estudo de controle de casos não prova a causa. Por exemplo, se dois fatores não são independentes um do outro, tal como origem étnica e consumo dietético de alguns alimentos, um estudo de controle de casos pode encontrar uma associação significativa entre a doença e a origem étnica quando, na verdade, são os hábitos dietéticos, associados à etnicidade, que são os responsáveis. Por exemplo, a menor freqüência de doença arterial coronariana (CAD) entre os japoneses comparada com aquela vista nos norte-americanos torna-se menos pronunciada nos japoneses da primeira geração que emigraram para os EUA e adotaram os costumes dietéticos de seu novo lar.

Avaliação das Contribuições Relativas dos Genes e Ambiente para Doenças Complexas

Concordância e Alelos Compartilhados entre Parentes

Quanto mais proximamente aparentadas forem duas pessoas em uma família, mais alelos elas têm em comum, herdados de seus ancestrais comuns. Ao contrário, quanto mais afastado o parente estiver do probando, menos alelos serão compartilhados entre o probando e o parente. Uma maneira de analisar minuciosamente a contribuição dos efeitos ambientais na doença multifatorial é comparar a concordância da doença nos parentes que são ligados de modo mais próximo ou menos próximo ao probando. Quando os genes são contribuintes importantes para uma doença, a freqüência de concordância da doença aumenta à medida que o grau de parentesco aumenta. Os exemplos mais extremos de duas pessoas tendo alelos em comum são os gêmeos idênticos (**monozigóticos [MZ]**) (ver adiante neste capítulo), que têm os mesmos alelos em cada locus. Em seguida, as pessoas relacionadas de maneira mais próxima em uma família são os parentes em primeiro grau, tais como um genitor e seu filho ou um par de irmãos, incluindo os gêmeos fraternos (**dizigóticos [DZ]**). Em um par genitor-filho, a criança tem apenas um alelo em comum com cada genitor em cada locus, isto é, o alelo que a criança herda deste genitor. Para um par de irmãos (incluindo os gêmeos DZ), a situação é um pouco diferente. Um par de irmãos herda os mesmos dois alelos em um locus em 25% das vezes, nenhum alelo em comum em 25% das vezes e apenas um alelo em comum em 50% das vezes (Fig. 15.1). Em qualquer locus, o número médio de alelos que um irmão compartilha com outro é, portanto, dado por

$$0{,}25\ (2\ \text{alelos}) + 0{,}5\ (1\ \text{alelo}) + 0{,}25\ (0\ \text{alelo}) = 1\ \text{alelo}$$

Por exemplo, se os genes predispõem a uma doença, pode-se esperar que λ_r seja maior para os gêmeos MZ (ver Quadro 15.2), diminua para os parentes em primeiro grau, tais como os irmãos ou pares genitor-filho, e continue a diminuir à medida que o compartilhamento de alelos diminui entre os parentes mais distantes de uma família (Quadro 15.3).

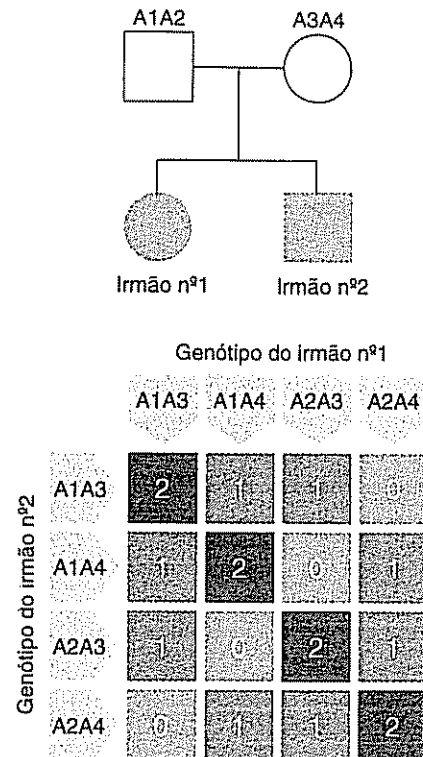



Fig. 15.1 O compartilhamento de alelos em um locus arbitrário entre irmãos concordantes para uma doença. Os genótipos dos pais são mostrados como *A1A2* para o pai e *A3A4* para a mãe. Todos os quatro genótipos possíveis para o irmão n.º1 são dados na parte de cima do quadro e todos os quatro genótipos possíveis para o irmão n.º 2 são dados do lado esquerdo do quadro. Os números dentro dos boxes representam o n.º de alelos que ambos os irmãos têm em comum para todas as 16 diferentes combinações de genótipos entre eles. Por exemplo, o canto esquerdo superior tem o número 2 porque tanto o irmão n.º 1 quanto o irmão n.º 2 têm o genótipo *A1A3* e, assim, têm os alelos *A1* e *A3* em comum. O canto esquerdo inferior contém o número 0 porque o irmão n.º 1 tem o genótipo *A1A3*, enquanto o irmão n.º 2 tem o genótipo *A2A4*; logo, não há alelos em comum.

Separação de Fatores Genéticos e Ambientais

Quanto mais proximamente aparentadas são duas pessoas, mais provável é que elas também compartilham ambientes familiares. Um modo de separar o ambiente familiar da influência genética

QUADRO 15-3

Grau de Parentesco e Alelos em Comum

Parentesco com o Probando	Proporção de Alelos em Comum com o Probando
Gêmeos monozigóticos	1
Parente em primeiro grau	1/2
Parente em segundo grau	1/4
Parente em terceiro grau	1/8

Ver Cap. 5, Fig. 5.2, para descrição dos graus de parentesco

é comparar a incidência da doença nos membros familiares não-aparentados (adotados, cônjuges) dos parentes biológicos. Em um estudo da esclerose múltipla, por exemplo, λ_r = 20 a 40 nos parentes biológicos de primeiro grau (genitores, filhos e irmãos), mas λ_r = 1 nos irmãos ou filhos adotados pela família, o que sugere que grande parte da agregação familiar na esclerose múltipla é genética e não de origem ambiental.

Estudos de Gêmeos

Outro método comum de separar as influências genéticas das ambientais sobre a doença é estudar os gêmeos, tanto MZ quanto DZ. Os gêmeos são os "experimentos da natureza" que chegam mais perto de fornecer uma oportunidade para avaliar as influências ambientais e genéticas separadamente em seres humanos. Os DZ criados juntos permitem que os geneticistas avaliem a concordância em parentes que crescem em ambientes similares, mas não compartilham todos os seus genes, enquanto os gêmeos MZ fornecem uma oportunidade para comparar parentes com genótipos idênticos que podem ou não ser criados juntos no mesmo ambiente. Os estudos de gêmeos tiveram um papel significativo em ajudar os geneticistas a avaliar as contribuições relativas dos genes e do ambiente na causa das doenças.

Os gêmeos MZ surgem da clivagem de um único zigoto fertilizado em dois zigotos separados no início da embriogênese. Como resultado, os gêmeos MZ têm genótipos idênticos em cada locus e são sempre do mesmo sexo. Eles ocorrem em cerca de 0,3% de todos os nascimentos, sem diferenças significativas entre grupos étnicos diferentes. Os gêmeos DZ surgem da fertilização simultânea de dois ovócitos por dois espermatozóides. Geneticamente, os gêmeos DZ são irmãos que compartilham um útero e, como todos os irmãos, compartilham, em média, 50% dos alelos em todos os loci. Os gêmeos DZ são do mesmo sexo em metade das vezes e de sexos opostos na outra metade. Os gêmeos DZ ocorrem com uma freqüência que varia até cinco vezes em populações diferentes, desde 0,2% entre os asiáticos até mais de 1% dos nascimentos em partes da África e entre os afro-americanos, o que sugere que deve haver uma base herdável para as diferenças na freqüência de gêmeos DZ.

Determinação da Zigosidade em Gêmeos

A determinação de se gêmeos do mesmo sexo são MZ ou DZ em geral requer um exame cuidadoso de muitas características, tais como o apecto da placenta, o número de membranas coriônicas e amnióticas que circundam as crianças, as características físicas, tais como cor dos cabelos e olhos, as impressões digitais, os grupos sanguíneos e outros marcadores sorológicos (ver Caps. 6 e 14). O advento de marcadores altamente polimórficos de DNA (ver Cap. 6, Fig. 6.6) hoje nos dá uma determinação confiável da zigosidade com uma probabilidade extremamente alta e superou os métodos antigos.

Concordância de Doença em Gêmeos Monozigóticos

Um exame do quão freqüentemente os gêmeos MZ são concordantes para uma doença é um método poderoso para determinar se apenas um genótipo é suficiente para produzir uma determinada doença. Por exemplo, se um gêmeo MZ tem anemia falciforme, o outro gêmeo também terá anemia falciforme. Em contraste, quando um gêmeo MZ tem diabetes melito tipo 1 (antes conhecida como insulino-dependente ou diabetes juvenil), apenas cerca de 40% dos outros gêmeos também terão diabetes tipo 1. *Uma concordância de doença menor que 100% em gêmeos MZ é uma forte evidência de que fatores não-genéticos têm um papel na doença.* Tais fatores podem incluir influências ambientais, tais como exposição à infecção ou dieta, bem como outros efeitos, tais como mutação somática, efeitos de idade ou diferenças de inativação do X em um gêmeo em comparação com o outro.

Comparação da Concordância de Gêmeos Monozigóticos versus Dizigóticos

Os gêmeos MZ e os DZ de mesmo sexo compartilham um ambiente intra-uterino comum, o sexo e em geral são criados juntos, na mesma casa e pelos mesmos genitores. Assim, uma comparação de concordância para uma doença entre gêmeos MZ e dizigóticos do mesmo sexo mostra o quão freqüentemente a doença ocorre quando os parentes que foram expostos ao mesmo ambiente pré-natal e, possivelmente, pós-natal têm todos os seus genes em comum comparados a apenas 50% de seus genes em comum. *Uma concordância maior em gêmeos MZ* versus *gêmeos DZ é uma forte evidência de um componente genético da doença* (Quadro 15.4). Esta conclusão é mais forte para condições com início precoce, tais como os defeitos de nascimento. Para as doenças de manifestação tardia, tais como as doenças neurodegenerativas de vida adulta avançada, a suposição de que os gêmeos MZ e DZ são expostos a componentes similares durante sua vida adulta torna-se menos válida e, portanto, uma diferença em concordância fornece uma evidência menos forte de fatores genéticos na causa da doença.

Gêmeos Criados Separados

Se os gêmeos MZ são separados ao nascimento e criados separadamente, os geneticistas têm a oportunidade de observar a concordância em indivíduos com genótipos idênticos criados em ambientes diferentes. Tais estudos foram usados inicialmente em pesquisas de distúrbios psiquiátricos, abuso de substâncias e distúrbios alimentares, nos quais fortes influências ambientais dentro da família são vistas como tendo um papel no desenvolvimento da doença. Por exemplo, em um estudo de alcoolismo, cinco ou seis pares de gêmeos MZ criados separados eram concordantes

QUADRO 15-4

Taxas de Concordância em Gêmeos MZ e DZ

Distúrbio	Concordância (%) MZ	DZ
Epilepsia não-traumática	70	6
Esclerose múltipla	17,8	2
Diabetes tipo 1	40	4,8
Esquizofrenia	53	15
Osteoartrite	32	16
Artrite reumatóide	12,3	3,5
Psoríase	72	15
Fenda labial com/sem palato fendido	30	5
Lupus eritematoso sistêmico	22	0

Dados adaptados de Rimoin D.L., Connor J.M., Pyeritz R.E. (1997) Emery e Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3.ª ed. Churchill Livingstone, Edinburgh; King R.A., Rotter J.I., Motulsky A.G. (1992) The Genetic Basis of Common Diseases. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra; Tsuang M.T. (1998) Recent advances in genetic research on schizophrenia. J Biomed Sci 5:28-30.

para o alcoolismo, uma taxa de concordância pelo menos tão alta quanto aquela vista entre os gêmeos MZ criados juntos, o que sugere que fatores genéticos compartilhados são bem mais importantes que um ambiente compartilhado.

Limitações dos Estudos em Gêmeos

Muito embora os estudos de gêmeos sejam úteis para distinguir o efeito dos fatores genéticos e ambientais na doença, eles devem ser interpretados com cuidado por vários motivos. Primeiro, os gêmeos MZ não têm uma expressão gênica exatamente idêntica, a despeito de terem genótipos idênticos: por exemplo, no cromossomo X, a inativação aleatória do X após a clivagem em dois zigotos MZ femininos produz diferenças significativas na expressão dos alelos de genes ligados ao X em tecidos diferentes (ver Cap. 5, Fig. 5.16). Os rearranjos somáticos de imunoglobulina e loci receptores de células T também irão diferir entre os gêmeos MZ em vários subgrupos de linfócitos (ver Cap. 14). Segundo, as exposições ambientais podem não ser as mesmas para os gêmeos, especialmente quando os gêmeos atingem a vida adulta e deixam o lar. Mesmo o ambiente intra-uterino pode não ser o mesmo. Por exemplo, os gêmeos MZ com freqüência compartilham uma placenta, e pode haver uma disparidade entre os gêmeos no suprimento de sangue, no desenvolvimento intra-uterino e no peso de nascimento. Terceiro, é importante notar que as medidas da concordância para doença nos gêmeos MZ dão uma estimativa média que pode não ser precisa se os alelos predisponentes ou fatores ambientais forem diferentes em pares diferentes de gêmeos. Suponha que o genótipo de um par de gêmeos gere um risco maior para a doença que o genótipo de outro par. A concordância observada será uma média que não se aplica de fato a nenhum dos pares de gêmeos. Como um exemplo mais extremo, a doença pode nem sempre ser de origem genética, isto é, podem existir fenocópias não-genéticas. Se apenas o genótipo causar a doença em alguns pares de gêmeos (concordância de 100% em gêmeos MZ) e uma fenocópia não-genética afetar um gêmeo do par em outro grupo de gêmeos (concordância de 0% em gêmeos MZ), os estudos de gêmeos mostrarão um nível intermediário de concordância maior que 0% e menor que 100% que não se aplica de fato a nenhuma das formas da doença. Por fim, a tendenciosidade de averiguação é um problema, particulamente quando um gêmeo com uma determinada doença é solicitado a pedir que o outro gêmeo participe de um estudo (**averiguação em base voluntária**), em vez de serem averiguados primeiro como gêmeos e apenas depois sua situação de saúde ser examinada (**averiguação baseada na população**). A averiguação em base voluntária pode dar resultados tendenciosos porque os gêmeos, em particular os MZ, que podem ser emocionalmente ligados, têm mais probabilidade de ser voluntários se forem concordantes do que se não forem, o que eleva a taxa de concordância. Para uma primeira aproximação, entretanto, os gêmeos oferecem uma oportunidade incomum para estudar a ocorrência da doença quando as influências genéticas são mantidas constantes (medindo-se a concordância da doença nos gêmeos MZ criados juntos ou separados) ou quando diferenças genéticas estão presentes, mas as influências ambientais são similares (comparando-se a concordância da doença em gêmeos MZ *versus* DZ).

ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS

Os valores fisiológicos mensuráveis, tais como a pressão sanguínea, o colesterol sérico e o índice de massa corpórea (como uma medida de obesidade), variam entre indivíduos diferentes e são determinantes importantes de saúde e doença na população. Tal variação em geral se deve a diferenças nos genótipos, bem como a fatores não-genéticos (ambientais). O desafio para os geneticistas é determinar a amplitude com que os genes contribuem para esta variabilidade, identificar estes genes e averiguar os alelos responsáveis.

Distribuição Normal

Como em geral é o caso com valores fisiológicos avaliados em uma população, um gráfico do número de indivíduos de uma população (eixo y) que tenha um determinado valor quantitativo (eixo x) produz a familiar curva em forma de sino conhecida como **distribuição normal (gaussiana)** (Fig. 15.2). Em um gráfico da freqüência populacional de um valor distribuído normalmente, a posição do pico do gráfico e a forma do gráfico são controladas por duas quantidades: a **média** (μ) e a **variança** (σ^2), respectivamente. A média é a média aritmética dos valores, e, como mais pessoas têm valores da característica próximos à média, a curva tem seu pico no valor médio. A **variança** (ou sua raiz quadrada, o **desvio padrão**, σ) é uma medida do grau de amplitude dos valores para ambos os lados da média e determina a largura da curva. Qualquer valor fisiológico que possa ser dosado é um **fenótipo quantitativo**, com uma média e uma variança. A variança de uma quantidade medida na população é, portanto, chamada de **variança fenotípica total**.

A Faixa Normal

O conceito de faixa normal de uma quantidade fisiológica é fundamental na medicina clínica. Por exemplo, estatura muito alta ou baixa, hipertensão, hipercolesterolemia e obesidade são todas consideradas anormais quando um valor fica claramente fora da faixa normal. Ao avaliar a saúde e a doença em crianças, a altura, o peso, a circunferência da cabeça e outras medidas são comparadas com as medidas "normais" que se espera para o sexo e a idade da criança. Mas como é determinada a "faixa normal"? Em muitas situações em medicina, um determinado valor fisiológico medido é "normal" ou "anormal" dependendo do quanto ele dista acima ou abaixo da média. A distribuição normal fornece orientações para estabelecer os limites da faixa normal. A teoria estatística básica diz que quando uma característica quantitativa é normalmente distribuída em uma população, apenas cerca de 5% da população terá medidas maiores que 2 desvios padrão acima ou abaixo da média populacional. (Note que a palavra "normal" é usada aqui de dois modos diferentes. Avaliar que um valor fisiológico tem uma distribuição normal na população e dizer que um valor individual está na faixa normal são usos diferentes da mesma palavra.)

Agregação Familiar de Características Quantitativas

Do mesmo modo que a agregação familiar, medida por λ_r e pelos estudos de controle de casos, é usada para avaliar o papel da hereditariedade nas doenças qualitativas, os estudos familiares também podem ser usados para determinar o papel da hereditariedade nas características quantitativas. As características quantitativas, entretanto, não estão presentes ou ausentes. Elas são medidas. Em conseqüência, não podemos simplesmente comparar a prevalência da doença nos parentes *versus* nos

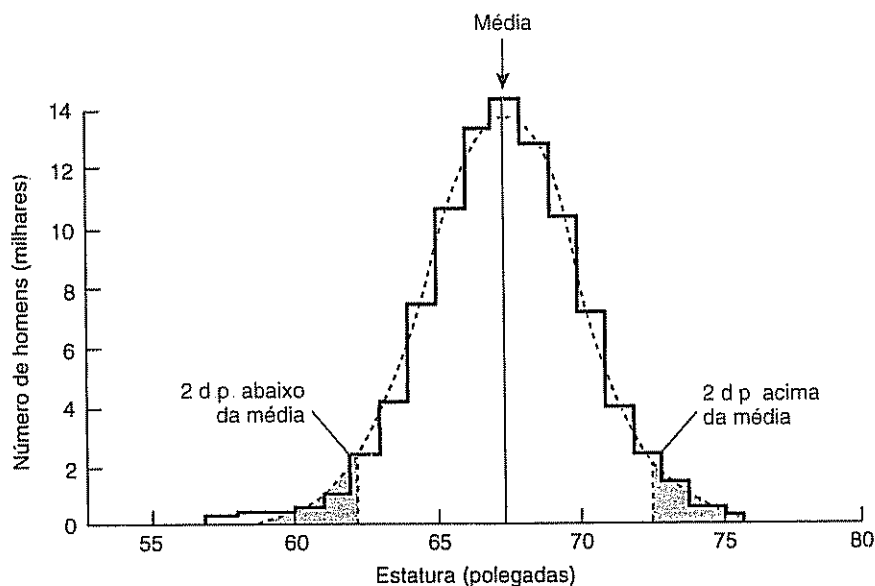



Fig. 15.2 Distribuição da estatura em uma amostra de 91 163 homens jovens ingleses em 1939 A linha vermelha é uma curva normal (gaussiana) com a mesma média e desvio padrão (d p) que os dados observados As áreas escuras indicam pessoas com estatura incomumente alta ou baixa (maior que dois d p acima ou abaixo da média) (Adaptada de Harrison G A . Weiner J S . Tanner J M . *et al* [1977] Human Biology. 2 ª ed Oxford University Press. Oxford. Inglaterra) 1 polegada = 2,54 cm

controles ou o grau de concordância nos gêmeos. Em vez disso, os geneticistas medem a **correlação** de valores fisiológicos específicos entre os parentes, isto é, a tendência de que os valores reais de uma avaliação fisiológica sejam mais similares entre os parentes do que entre a população em geral. O **coeficiente de correlação** (simbolizado pela letra **r**) é uma medida estatística aplicada a um par de medidas, tais como, por exemplo, a pressão sanguínea de uma pessoa e a pressão sanguínea média dos irmãos desta pessoa. Existirá uma **correlação positiva** entre a pressão sanguínea medida em um grupo de pacientes e as medidas de pressão sanguínea de seus parentes se for encontrado que quanto mais alta a pressão sanguínea do paciente, maiores as pressões sanguíneas dos parentes do paciente. (Existe uma **correlação negativa** quando quanto maior é o aumento na medida do paciente, mais baixa é a medida nos parentes do paciente. As medidas ainda estão correlacionadas, mas em sentido oposto.) O valor de r pode variar de 0, quando não há correlação, a +1 para uma correlação positiva e a −1 para uma perfeita correlação negativa.

A Fig. 15.3 mostra um gráfico da altura média de mais de 200 pares de genitores plotados contra a altura média de seus quase 1.000 filhos adultos. Há uma correlação positiva, mas não perfeita (r = ± 0,6), entre a altura parental média e a altura média de seus filhos.

A correlação entre parentes pode ser usada para avaliar a influência genética em uma característica quantitativa se for suposto que o grau de similaridade nos valores da característica medida entre os parentes é proporcional ao número de alelos que eles compartilham em loci relevantes para esta característica. Quanto mais próximo o parentesco das pessoas em uma família, mais provável é que elas compartilhem alelos em loci que determinam a característica quantitativa e mais fortemente correlacionados serão seus valores. Entetanto, como nas características de doenças que são encontradas segregando em famílias porque os parentes compartilham genes e fatores ambientais, a correlação de um determinado valor fisiológico entre parentes reflete a influência tanto da hereditariedade quanto dos fatores ambientais comuns. Uma correlação não indica que os genes sejam totalmente responsáveis por qualquer correlação que exista.

Herdabilidade

O conceito de **herdabilidade** (simbolizado por h^2) foi desenvolvido para quantificar o papel das diferenças genéticas na determinação da variabilidade das características quantitativas. A herdabilidade é definida como a fração da variança fenotípica total de uma característica quantitativa que é causada por genes e é, portanto, uma medida da extensão na qual diferentes alelos em vários loci são responsáveis pela variabilidade de uma determinada característica quantitativa vista em uma população. Quanto maior a herdabilidade, maior a contribuição das diferenças genéticas entre as pessoas no que diz respeito a causar variabilidade da característica. O valor de h^2 varia de 0, se os genes não contribuem para a variança fenotípica total, a 1, se os genes são totalmente responsáveis pela variança fenotípica.

A herdabilidade de uma característica é um conceito um tanto teórico que é estimado pela correlação entre as medidas desta característica entre os parentes de conhecidos graus de parentesco, tais como pais e filhos, irmãos ou, como descrito em seguida, gêmeos MZ e DZ. Existem, entretanto, várias dificuldades práticas para medir e interpretar a h^2. Uma delas é que os parentes compartilham mais que seus genes; eles também compartilham exposições ambientais e, assim, a correlação entre parentes pode não refletir apenas seu parentesco. Mesmo quando a herdabilidade de uma característica é alta, ela não revela o mecanismo subjacente de herança da característica, tal como o número de loci envolvidos ou como os vários alelos nestes loci interagem. Finalmente, embora seja tentador pensar em herdabilidade como uma qualidade intrínseca de uma característica quantitativa em particular, ela não pode ser considerada isolada do grupo populacional e das condições de vida nas quais a estimativa está sendo feita.

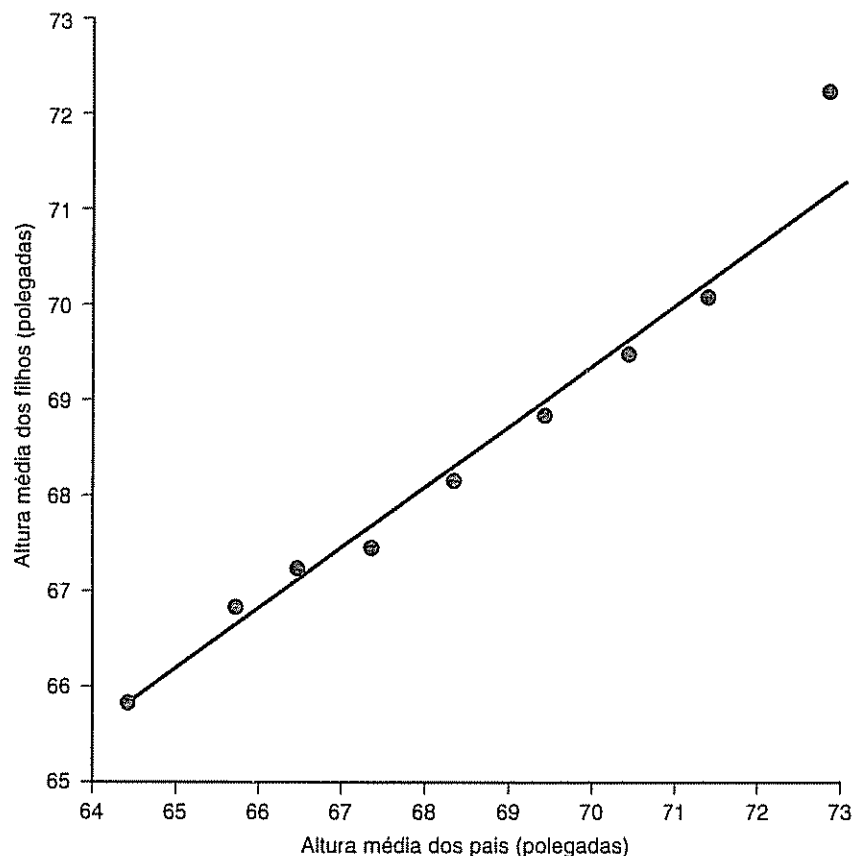



Fig. 15.3 Correlação entre a altura parental média e a altura dos filhos A altura média dos pais dentro de intervalos de 1 polegada (64 a 65 polegadas, 65 a 66 polegadas etc) é plotada ao longo da abscissa A altura média dentro de um intervalo de 1 polegada de seus filhos é plotada na ordenada A linha reta é um "ajuste melhor" entre os pontos (O observador astuto notará que a inclinação da linha não é de 45 graus Isto reflete o fato de que os filhos de pais altos, embora ainda mais altos que a média, tendem a ser mais baixos que seus pais, enquanto os filhos de pais baixos, embora ainda mais baixos que a média, tendem a ser mais altos que seus pais Este fenômeno, conhecido como "regressão à média", foi observado há mais de 100 anos por Galton) 1 polegada = 2,54 cm

Estimativa de Herdabilidade em Estudos de Gêmeos

Do mesmo modo que os dados de gêmeos podem ser usados para avaliar os papéis separados dos genes e do ambiente nas doenças qualitativas, eles também podem ser usados para estimar a herdabilidade de uma característica quantitativa A variança nos valores de uma medida fisiológica feita em um conjunto de gêmeos MZ (que compartilham 100% de seus genes) é comparada com a variança nos valores desta medida feitos em um conjunto de gêmeos DZ (que compartilham 50% de seus genes, em média). A fórmula para o cálculo de h^2 é dada por

$$h^2 = \frac{\text{variança em pares DZ} - \text{variança em pares MZ}}{\text{variança em pares DZ}}$$

(A derivação desta equação está além do escopo deste livro.) Se a variabilidade da característica for determinada principalmente pelo ambiente, a variança dentro de pares de gêmeos DZ será muito similar àquela vista dentro de pares de gêmeos MZ, e o numerador — e, portanto, a própria h^2 — se aproximará de 0. Se a variabilidade for determinada exclusivamente pela constituição genética, a variança de pares MZ será zero, e h^2 será 1.

A estatura do adulto tem sido estudada pelos geneticistas por décadas como um modelo de como as contribuições genéticas e ambientais para uma característica quantitativa podem se somar. Foi coletado um grande número de medidas (de militares recrutados, por exemplo). Um gráfico da freqüência de várias alturas na população (ver Fig 15.2) demonstra uma curva em forma de sino que se ajusta à distribuição normal. Usando o método dos gêmeos em amostras colhidas no nordeste da Europa, a h^2 é estimada como sendo de cerca de 0,8, o que indica que a maior parte da variabilidade na estatura entre os indivíduos deve-se a diferenças genotípicas entre eles, e não a diferenças nas exposições ambientais. Assim, os genes têm um papel bem maior na determinação da estatura adulta do que o ambiente.

Como outro exemplo, uma comparação de gêmeos MZ criados juntos ou separados com gêmeos DZ criados juntos ou separados é um modo clássico de medir a herdabilidade de características complexas. Os estudos do índice da massa corpórea dos gêmeos mostrou um alto valor de herdabilidade, indicando que há uma forte influência da herdabilidade no índice de massa corpórea (h^2 = 0,70 a 0,80).

É preciso fazer várias suposições simplificadoras quando se usam gêmeos para estimar a herdabilidade. A primeira é que os gêmeos MZ e DZ do mesmo sexo e criados juntos só diferem no que diz respeito a compartilhar todos os genes (MZ) ou, em média, a metade deles (DZ), embora suas experiências e exposições ambientais sejam idênticas. Ao analisar a herdabilidade da estatura, tais suposições podem não

Características da Herança de Doenças Complexas

1. As doenças com herança complexa não são distúrbios monogênicos e não demonstram um padrão mendeliano simples de herança.
2. As doenças com herança complexa demonstram agregação familiar, pois é mais provável que os parentes de uma pessoa afetada tenham alelos de predisposição a doenças em comum com a pessoa afetada que as pessoas não-aparentadas.
3. Os pares de parentes que compartilham genótipos de predisposição à doença em loci relevantes podem ainda ser discordantes para o fenótipo (falta de penetrância) devido ao papel crucial de fatores não-genéticos na causa das doenças. Os exemplos mais extremos de falta de penetrância, a despeito de genótipos idênticos, são os gêmeos monozigóticos (MZ) discordantes.
4. A doença é mais comum entre parentes próximos do probando e torna-se menos comum em parentes que são menos próximos. Espera-se uma concordância maior para a doença entre os gêmeos MZ *versus* os dizigóticos (DZ)

estar muito distantes do esperado, mas elas são muito mais difíceis de justificar quando se estima a herdabilidade de medidas quantitativas mais complicadas, tais como o índice de massa corpórea ou valores em perfis de personalidade e testes de QI. Outro problema importante é que nem sempre é possível extrapolar a herdabilidade estimada para os gêmeos para a população como um todo, para grupos étnicos diferentes ou mesmo para o mesmo grupo, se as condições socioeconômicas mudam com o tempo.

MAPEAMENTO GENÉTICO DE CARACTERÍSTICAS COMPLEXAS

Uma vez que uma doença herdada como uma característica complexa demonstre ter um componente hereditário, a etapa seguinte é mapear os genes envolvidos e identificá-los. Dois enfoques importantes têm sido usados para localizar e identificar genes que predispõem a doenças complexas ou contribuem para a variança genética de características quantitativas. O primeiro é um tipo de análise de ligação que se baseia em pares de membros familiares, tais como irmãos, que são concordantes para o fenótipo (**método do membro afetado da família**). Como mostra a Fig. 15.1, os irmãos têm, em média, 50% de seus alelos em comum (idênticos por descendência de seus genitores comuns) em qualquer locus. Se uma região do genoma é compartilhada com mais freqüência do que se poderia esperar por parentes concordantes para um determinado fenótipo, deduz-se que existam alelos que predispõem a este fenótipo em um ou mais loci nesta região. O segundo enfoque é a **associação**, que procura freqüências aumentadas de alelos em particular em pessoas afetadas em comparação com indivíduos não-afetados na população. Ambos os enfoques têm vantagens e desvantagens em situações específicas, como descrito mais adiante.

Análise de Ligação Livre de Modelo de Doenças Complexas

A análise padrão de ligação, como descrita no Cap. 8, é um método poderoso para o mapeamento dos distúrbios monogênicos, mas raramente é aplicável às características complexas. A análise de ligação depende de que se suponha um modo de herança e então se conte a prole não-recombinante e recombinante nas famílias para (1) determinar se há evidência de um locus genético que recombine com o locus da doença em uma freqüência θ que seja menor que os 50% esperados com loci não-ligados e (2) avaliar o valor do parâmetro θ que dá o mais alto valor lod, θ_{max} (ver Cap. 8). Este enfoque da análise de ligação é chamado de **análise de ligação baseada em modelo** (ou **paramétrica**) porque supõe que há um modo particular de herança (autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X) que explica o padrão de herança. Por sua natureza, as doenças herdadas como características complexas nem sempre são passíveis de uma análise que dependa de se saber que uma mutação em um único gene, herdado em um padrão de herança mendeliano específico, causa a doença. Ao contrário, os **métodos livres de modelo** (ou **não-paramétricos**) foram desenvolvidos sem fazer suposição quanto ao número de loci ou o papel do ambiente e a chance de causar falta de penetrância. Os métodos livres de modelo dependem apenas da suposição de que dois parentes afetados terão alelos em comum de predisposição à doença.

Um tipo de análise do modelo livre é o **método do par de gêmeos afetados**. Apenas os irmãos concordantes para uma doença são usados, eliminando-se, assim, o problema de determinar se uma pessoa não-afetada é um portador não-penetrante dos alelos que predispõem à doença ou simplesmente não os herdou. Nenhuma suposição precisa ser feita sobre o número de loci envolvidos ou o padrão de herança. Em vez disso, os irmãos são analisados para determinar se existem loci nos quais pares de irmãos afetados compartilham alelos com mais freqüência que os 50% esperados apenas por acaso (ver Fig. 15.1). O que acontece se centenas de pares de irmãos concordantes para a doença forem sistematicamente estudados quanto ao compartilhamento de alelos em loci ao longo do genoma? Tenha em mente que podem haver múltiplos loci que predispõem à doença; logo, nem todos os pares de irmãos concordantes para uma doença compartilharão alelos nos mesmos loci. Entretanto, se um locus em particular for um contribuinte importante para a doença, será visto um grau de compartilhamento de alelos mais significativo que o grau esperado neste locus na coleção de pares de irmãos. Se o grau de compartilhamento de alelos diverge significativamente dos 50% esperados apenas por acaso, pode ser avaliado usando-se a proporção de *maximum likelihood*, assim como a análise de ligação baseada em modelo usa o valor lod para avaliar se uma freqüência de recombinação menor que 50% é significativa (ver Cap. 8).

No método do par de irmãos afetados, o DNA dos irmãos afetados é sistematicamente analisado usando-se centenas de marcadores polimórficos ao longo de todo o genoma (**uma varredura genômica**) à procura de regiões que são compartilhadas por dois irmãos significativamente com mais freqüência que o que se poderia esperar em uma base apenas aleatória. Quando são encontrados graus elevados de compartilhamento de alelos em um marcador polimórfico, isto sugere que um locus envolvido na doença está situado perto do marcador. Entretanto, considere que quanto mais polimórficos forem os loci estudados, mais provável será que um locus apresente um compartilhamento de alelos elevado apenas por acaso. Para compreender o porquê,

considere o exemplo de lançar uma moeda. Embora seja improvável que um único experimento de lançar uma moeda cinco vezes resulte em cinco caras, é muito provável que, se o experimento for repetido centenas de vezes, pelo menos um dentre as centenas de experimentos produza cinco caras. Níveis significativos e um valor de lod correspondente (ver Cap. 8) para aumento de compartilhamento de alelos em uma varredura genômica usando cerca de 400 marcadores foram propostos para reduzir o risco de atribuir significância imprópria ao que é apenas uma flutuação dos níveis esperados de compartilhamento de alelos. Nesta situação, um valor lod maior que aproximadamente 3,6 para compartilhamento de alelos em um locus ocorreria com uma probabilidade de menos de 1 em 20 apenas por acaso. Um valor lod maior que 5,4 ocorreria por acaso apenas uma vez em 1.000 estudos.

Embora o método de par de irmãos afetados evite fazer suposições possivelmente incorretas sobre quantos loci estão envolvidos e como os alelos nestes vários loci interagem para causar uma doença, isto é feito ao custo de ser insensível e impreciso. Sua insensibilidade reflete-se no fato de que grandes números de pares de irmãos são necessários para detectar um desvio significativo dos 50% esperado de compartilhamento de alelos. Suponha, por exemplo, que um alelo em um locus de doença tenha uma freqüência de 10% na população e aumente quatro vezes o risco de doença nos heterozigotos e 16 vezes nos homozigotos. Nesta situação, nas melhores circunstâncias, estima-se que seriam necessários 185 pares de irmãos para detectar uma elevação de compartilhamento de alelos para quase 60%. Se o locus for um contribuinte relativamente infreqüente para a doença ou causar muito menos aumento no risco da doença que quatro vezes nos heterozigotos, uma elevação de compartilhamento de alelos maior que 50% será proporcionalmente menor, e seriam necessários muito mais pares de irmãos, na casa de milhares ou dezenas de milhares, para detectar o locus. Assim, do ponto de vista prático, é improvável que os métodos de pares de irmãos afetados identifiquem loci nos quais apenas alguns alelos raros causam pequenas contribuições para uma doença.

Os métodos livres de modelo também são imprecisos. Como não estamos supondo que um único gene ou um determinado padrão de herança está envolvido, não podemos determinar definitivamente se ocorreu uma recombinação entre um possível locus predisponente à doença e o fenótipo da doença. Na estratégia de ligação baseada em modelo para mapeamento fino de uma doença monogênica (ver Cap. 8), encontrar marcadores bem próximos em ambos os lados do gene da doença que *se recombinem* pelo menos uma vez com o gene da doença define os limites de um intervalo pequeno e crucial, no qual deve estar o gene da doença. Os métodos livres de modelo só podem identificar amplas regiões com aumento de compartilhamento de alelos, e não uma região estreita e crucial que delimite a localização de um gene contribuinte para uma característica complexa.

Análise de Ligação Livre de Modelo e Características Quantitativas

Métodos de ligação livre de modelo baseados em compartilhamento de alelos também podem ser usados para mapear loci envolvidos em características quantitativas complexas. Embora vários enfoques estejam disponíveis, um exemplo interessante é o **método do par de irmãos altamente discordante**. Mais uma vez, não é necessária nenhuma suposição sobre o número de loci envolvidos ou o padrão de herança. Supõe-se que pares de irmãos altamente discordantes para a caracterísica quantitativa, isto é, com valores de uma dosagem fisiológica que estão nas extremidades opostas de uma curva em forma de sino, tenham menos probabilidade de compartilhar alelos que contribuem para a característica. O DNA de irmãos altamente discordantes é então sistematicamente analisado usando-se marcadores polimórficos ao longo de todo o genoma, à procura de regiões que sejam compartilhadas pelos dois irmãos significativamente com *menos* freqüência que o que se poderia esperar em uma base apenas aleatória. Quando são encontrados níveis reduzidos de compartilhamento de alelos em um marcador polimórfico, isto sugere que o marcador está ligado a um locus cujos alelos contribuem para qualquer dosagem fisiológica que esteja em estudo.

Associação à Doença

O fato de um determinado alelo em um locus estar presente com uma freqüência aumentada nos indivíduos afetados em comparação aos controles é conhecido como **associação à doença**. Os métodos de associação são uma forma de estudo de controle de casos no qual a freqüência de *um determinado alelo* (tal como para o antígeno de HLA) em um locus é comparado entre os indivíduos afetados e aqueles não-afetados na população (ver Cap. 14). A intensidade de uma associação é medida pela **proporção das chances** (*odds ratio*), que é calculada pela freqüência de um alelo específico em pacientes e controles.

	Com alelo	Sem alelo
Pacientes	a	c
Controles	b	d

a = n.º de pacientes com o alelo; b = n.º de controles com o alelo; c = n.º de pacientes sem o alelo; d = n.º de controles sem o alelo

A proporção das chances é então = ad/bc. Se a freqüência do alelo em questão fosse a mesma nos pacientes e nos controles, a proporção das chances seria 1.

Por exemplo, em um estudo de um grupo de 120 pacientes com trombose cerebral ou de veia profunda (discutida mais adiante neste capítulo) e 120 controles, uma determinada mutação no gene de protrombina foi encontrada em 23 pacientes e 4 controles. A proporção das chances é então = (23)(116)/(4)(97) = ± 7. Isto significa que as chances de desenvolver trombose são sete vezes maiores nas pessoas que possuem a mutação gênica de protrombina que nas que não possuem esta mutação.

Uma medida diferente mas correlata de associação é o **risco relativo** (RR), que compara o risco de desenvolver a doença quando uma pessoa possui um alelo específico de risco em relação a outra que não o possui. RR = (a/(a+c))/(b/(b+d)), aproximadamente igual às chances quando o alelo da doença é raro (p. ex., b<d e a<c). No caso do alelo mutante de protrombina e da trombose, RR = (23/120)/(4/120) = 5,75. (Não confunda RR com λ_r, o risco relativo, já discutido neste capítulo. λ_r é a prevalência de um fenótipo específico de doença nos parentes de uma pessoa afetada *versus* a população em geral.)

Pontos Fortes e Fracos dos Estudos de Associação

Os métodos de associação são poderosos instrumentos para identificar precisamente os genes que contribuem para as doenças genéticas porque demonstram não só os genes, mas também os alelos específicos responsáveis. Eles também são relativamente

fáceis de fazer porque precisamos de amostras apenas de um grupo de indivíduos afetados e de controles, não sendo necessário fazer estudos familiares trabalhosos e coleta de amostras de membros de um heredograma. Os estudos de associação devem ser interpretados com cautela, pois as chances aumentadas para um alelo em um determinado locus não provam que o alelo ou mesmo o locus no qual o alelo reside está envolvido na patogenia da doença.

Existem duas maneiras pelas quais as chances de possuir um determinado alelo podem ser aumentadas em pacientes com uma doença, sem que o alelo esteja envolvido na doença. Primeira, o alelo em questão pode estar em desequilíbrio de ligação (ver Cap. 8) com um alelo bem diferente em outro locus desconhecido, mas próximo, que de fato está envolvido na patogenia da doença. Quaisquer alelos em loci que estejam em desequilíbrio de ligação com o alelo e o locus envolvido na doença mostrarão chances aparentemente aumentadas e uma associação positiva. Uma segunda, e ainda mais séria, limitação dos estudos de associação é que eles são sensíveis ao efeito da estratificação da população (ver Cap. 7). Se uma população é estratificada em subpopulações separadas (tais como etnicidade e religião) e os membros de uma subpopulação raramente se reproduzem com membros de outras subpopulações, então a doença que é mais comum em uma subpopulação pode parecer (incorretamente) estar associada a quaisquer alelos que também sejam mais comuns nesta subpopulação que na população como um todo. As associações artificiais devidas à estratificação da população podem ser minimizadas, entretanto, com uma cuidadosa seleção dos controles, bem como com o uso de métodos mais sofisticados baseados em famílias para testar a associação entre uma doença e determinados alelos.

DOENÇAS COM HERANÇA COMPLEXA

Os distúrbios multifatoriais comuns que contribuem para grande parte da morbidade e mortalidade em crianças e adultos têm sido sempre um problema para os geneticistas. Usando a agregação familiar, as proporções de riscos relativos, os estudos de gêmeos e as estimativas de herdabilidade e concordância, a contribuição genética para as doenças ou características quantitativas com herança complexa pode ser deduzida e mesmo quantificada, sem especificar exatamente como muitos loci estão envolvidos ou como um genótipo em particular e um conjunto de influências ambientais resultam em uma doença ou em um valor determinado de uma característica quantitativa. Esta falta de precisão é um reflexo de nosso estado atual de conhecimentos. Em contraste com os defeitos monogênicos mendelianos, *existe apenas um punhado de doenças multifatoriais ou características humanas quantitativas para as quais os modelos genéticos subjacentes (o número de loci, a natureza dos fatores ambientais e a interação deles) são conhecidos*. Esta falta de conhecimento prejudica gravemente nossa capacidade de compreender o papel da hereditariedade nas doenças multifatoriais e de fazer previsões precisas quanto ao risco de doença em parentes com o fim de informação genética.

Historicamente, os geneticistas têm tentado compreender os mecanismos subjacentes pelos quais doenças complexas ou características quantitativas são herdadas criando modelos teóricos. Nestes modelos, os geneticistas especificam um conjunto de alelos em vários loci, vários fatores ambientais e a natureza das interações entre estes fatores, e então testam os modelos quanto à sua eficácia em prever o padrão de herança de uma doença observada em famílias e pacientes. Um bom ajuste entre a previsão teórica e a observação sugeriria que o modelo teórico é uma boa aproximação do verdadeiro mecanismo subjacente à doença. Infelizmente, muitos modelos diferentes podem resultar em padrões de herança quase idênticos, o que dificulta saber qual modelo está mais próximo do mecanismo subjacente correto. Com os avanços na tecnologia de mapeamento gênico, um segundo enfoque mais empírico está se tornando possível. Aplicando a análise de ligação livre de modelo e os estudos de associação em famílias, estão sendo determinados os loci e os alelos responsáveis por doenças herdadas como características complexas. A seguir, destacaremos o enfoque empírico em vez do teórico. Descrevemos várias doenças complexas, nas quais as contribuições genéticas começaram a ser identificadas, como exemplos de mecanismos genéticos responsáveis por doenças complexas. Apresentamos estas doenças em ordem de complexidade crescente, com os distúrbios mais bem conhecidos sendo discutidos primeiro.

Retinite Pigmentosa Digênica

Um exemplo simples de uma característica determinada pelo efeito aditivo de vários loci (**multigênica**) foi encontrado em algumas famílias de pacientes com uma forma de degeneração da retina chamada de retinite pigmentosa (Fig. 15.4). Duas mutações raras em dois genes diferentes não-ligados codificando proteínas encontradas no fotorreceptor estão presentes na família. Os pacientes heterozigotos, seja para uma determinada mutação de sentido trocado em um gene, codificando a proteína de membrana fotorreceptora periferina, ou para um alelo nulo no outro gene, codificando uma proteína de membrana fotorreceptora chamada Rom 1, não desenvolvem a doença. Os pacientes heterozigotos para ambas as mutações desenvolvem a doença. Assim, a herança desta doença é causada pela forma simples de herança multigênica, a herança digênica. Estas duas proteínas fotorreceptoras estão associadas não-covalentemente no empilhamento dos discos membranares que contêm os pigmentos visuais. Supõe-se que o efeito deletério de cada mutação isoladamente é insuficiente para causar a doença, mas sua presença conjunta é suficiente para ultrapassar um limiar de dano celular, morte do fotorreceptor e perda da visão.

Trombose Venosa Cerebral

Um outro exemplo de dois alelos mutantes que interagem para predispor a uma doença é encontrado no distúrbio conhecido como **trombose cerebral idiopática**. Neste caso, entretanto, há um terceiro fator, uma influência ambiental que, na presença de fatores genéticos de predisposição, aumenta o risco da doença ainda mais. A trombose cerebral idiopática é uma oclusão catastrófica das veias cerebrais que ocorre na ausência de um evento provocador, tal como uma infecção ou um tumor. Ela afeta adultos jovens e, embora muito rara (<1 por 100.000 na população), tem uma alta taxa de mortalidade (de 5% a 30%). Sabe-se que três fatores (dois genéticos e um ambiental) que levam a uma coagulabilidade anormal do sistema de coagulação aumentam individualmente o risco desta doença: uma mutação de sentido trocado comum em um fator de coagulação, o fator V, outra variante comum no fator de coagulação protrombina, e o uso de anticoncepcionais orais.

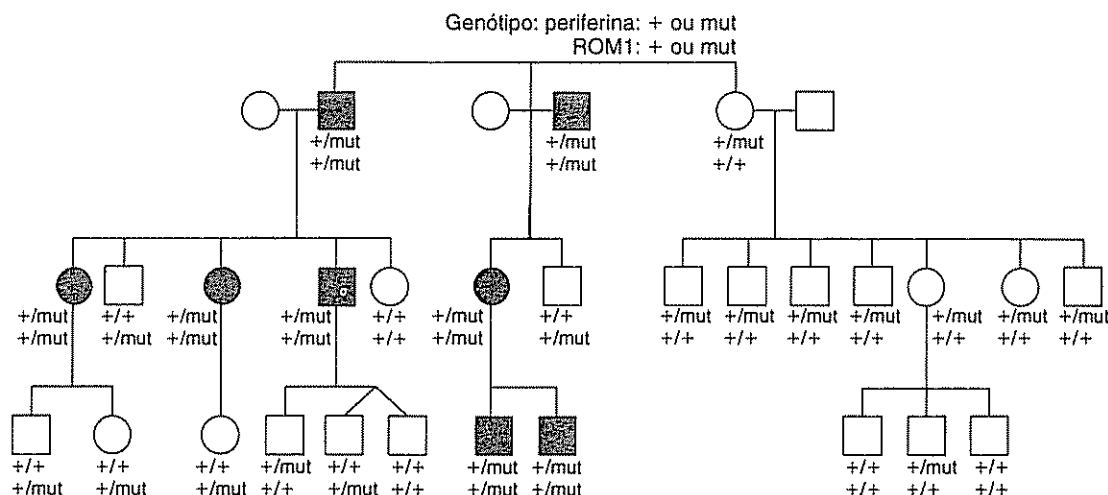



Fig. 15.4 Heredograma de uma família com retinite pigmentosa devida a uma herança digênica Os símbolos preenchidos são pessoas afetadas Cada genótipo das pessoas no locus da periferina (*primeira linha*) e no locus *ROM1* (*segunda linha*) são escritos abaixo de cada símbolo O alelo normal é +; o alelo mutante é mut (De Kajiwara K., Berson E. L., Dryja T P [1994] Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci Science 264:1604-1608)

Um alelo mutante de fator V (**fator V Leiden**), no qual a arginina é substituída por glutamina na posição 506 (Arg506Gli), tem uma freqüência alélica de cerca de 2,5% nos caucasianos, mas é mais rara em outros grupos populacionais. Os portadores heterozigotos do fator V Leiden têm um risco de trombose que é sete vezes maior que a população em geral. Os homozigotos têm um risco que é 80 vezes mais alto. Uma mutação no gene de protrombina que muda G por A na posição 20210 (G20210A) na região não-traduzida 3′ tem uma freqüência de cerca de 2,4% nos caucasianos, mas é rara em outros grupos. A mutação G20210A aumenta o risco de trombose venosa de três a seis vezes. Finalmente, o uso de anticoncepcionais orais aumenta o risco de trombose em 22 vezes, independente do genótipo nos loci do fator V e da protrombrina, provavelmente aumentando os níveis de muitos fatores de coagulação no sangue. Usar anticoncepcionais orais e ser heterozigota para o fator V Leiden causa um modesto aumento no risco comparado a um dos fatores isoladamente. Se uma mulher usa anticoncepcionais orais e é heterozigota para a mutação de protrombina, seu risco relativo aumenta para 149! Assim, cada um destes três fatores, dois genéticos e um ambiental, por si só aumenta o risco de um estado de hipercoagulação anormal Ter dois ou três destes fatores ao mesmo tempo aumenta ainda mais o risco para uma doença devastadora do sistema vascular cerebral.

Estes alelos nos loci do fator V e da protrombina, bem como um alelo para a metileno tetraidrofolato redutase sensível ao calor (ver discussão mais adiante), têm sido implicados como sérios fatores genéticos de predisposição à **trombose arterial placentária**. Possuir uma destas mutações aumenta o risco em uma média de cinco vezes em relação ao risco da população em geral para esta grave complicação obstétrica. A disfunção placentária resultante está associada à pré-eclâmpsia grave, à separação prematura da placenta da parede uterina, ao retardo do crescimento intra-uterino e ao natimorto.

A interação destes fatores genéticos com o uso de anticoncepcionais orais levou a uma proposta de que os médicos façam uma triagem nas mulheres quanto ao fator V de predisposição e mutações no gene de protrombina antes de prescrever pílula para o controle de natalidade.

Doença de Hirschsprung

Um conjunto mais complicado de fatores genéticos interativos foi descrito na patogenia de uma anomalia desenvolvimental do sistema nervoso parassimpático intestinal conhecida como **doença de Hirschsprung** (HSCR). Na HSCR, há uma ausência completa de algumas ou de todas as células ganglionares intrínsecas no plexo submucóide e mesentérico do cólon. Um cólon aganglionar é incapaz de peristaltismo, o que resulta em grave constipação, sintomas de obstrução intestinal e intensa dilatação do cólon (megacólon) proximal ao segmento aganglionar. A ausência de células ganglionares em geral ocorre em um único segmento contínuo que pode variar de tamanho desde algumas polegadas na parte distal do cólon até todo o tamanho do cólon. O distúrbio afeta cerca de 1 em cada 5.000 nascimentos. A HSCR ocorre mais comumente como um defeito isolado envolvendo apenas um segmento curto do cólon, mas também envolve longos segmentos colônicos e também pode ocorrer como um elemento de uma constelação mais ampla de anomalias congênitas, incluindo surdez e anomalias pigmentares dos cabelos e olhos (a síndrome de Waardenburg-Shah).

O padrão hereditário da HSCR tem muitas das características de um distúrbio com uma genética complexa. O risco relativo para irmãos, λ_s, é muito alto (cerca de 200), mas os gêmeos MZ não apresentam uma concordância perfeita. A HSCR pode ocorrer ao longo de várias gerações ou pode afetar vários irmãos em uma família, ou ambos, sugerindo um distúrbio autossômico dominante ou recessivo, mas os riscos de recorrência não são estritamente de 50% ou 25%, como se poderia esperar para doenças autossômicas dominantes ou autossômicas recessivas. Os homens têm o dobro do risco de desenvolver HSCR que as mulheres dentro da mesma família.

A análise de ligação e seqüências de DNA nas famílias com vários probandos revelou que as mutações em muitos genes diferentes podem causar a doença. A condição é mais comumente devida a mutações no gene *RET* localizado em 10q11.2, codificando ret, um receptor de tirosina cinase. Uma minoria das pessoas com HSCR tem mutações no gene que codifica um dos ligandos que se associa a ret, o fator neutrofílico derivado da

linhagem de células gliais (gdnf), enquanto outras pessoas foram descritas com mutações em um de um par de genes, o receptor de endotelina B (*EDNRB*) em 13q22, e no gene *EDN3* codificante de seu ligando, a endotelina 3, em 20q13. O envolvimento da endotelina 3 e seu receptor na HSCR foi uma surpresa, pois acreditava-se que estas moléculas tinham um papel na formação dos vasos sanguíneos, e não no desenvolvimento do sistema nervoso autônomo. A relação entre as vias de sinalização de *EDNRB* e *RET* também é bastante obscura, mas ambas as vias parecem funcionar em paralelo, em vez de em série, para promover o desenvolvimento de células ganglionares colônicas.

Embora as mutações em *RET* sejam a causa mais comum da HSCR que afeta vários indivíduos de uma família, a penetrância destes alelos *RET* estará longe de ser completa. Em algumas famílias, a penetrância estará aumentada se estas pessoas também tiverem uma mutação no gene para um dos ligandos que sinalizam por meio de ret, tais como gdnf. Em outras famílias, alelos ainda não identificados no locus em 19q31 foram demonstrados, por análise de ligação, como aumentando a penetrância. A explicação mais provável para estas observações é que alguns alelos mutantes de *RET* ainda apresentam uma função residual suficiente para impedir o desenvolvimento da doença, a menos que uma disfunção adicional em outros componentes das vias relevantes de sinalização também ocorram.

De modo semelhante, em uma grande família endogâmica de Menonitas, a análise de ligação revelou que a expressão do fenótipo HSCR devido a uma mutação em *EDNRE* era fortemente influenciada pelo genótipo da pessoa no locus *RET*. A despeito desta evidência genética implicando *RET* na penetrância de uma mutação *EDNRE*, entretanto, a seqüência da região codificante de *RET* nestes pacientes não revelou uma mutação deletéria óbvia. Não encontrar uma mutação óbvia na região codificante de *RET* serve para ilustrar que as mutações ou polimorfismos responsáveis por modificar a expressão de uma característica multifatorial podem ser bem sutis no modo como exercem seus efeitos na expressão gênica e, em conseqüência, na penetrância e expressividade da doença.

A natureza multifatorial de HSCR foi mais atentamente enfocada quando a base genética da forma mais comum de HSCR, envolvendo apenas um curto segmento do cólon, foi analisada em pares de irmãos concordantes para HSCR em famílias que não apresentavam nenhum padrão de herança dominante óbvio. A análise de ligação não-baseada em modelo (ver antes) em 67 pares de irmãos concordantes para HSCR revelou significativo compartilhamento de alelos em três loci: a região 10q11.2, onde *RET* está situado, e dois loci não-identificados em 3p21 e 19q12. A maioria dos 67 pares de irmãos concordantes para HSCR (55 de 67) compartilhava alelos em todos os três loci, enquanto apenas 12 pares de irmãos concordantes compartilhavam alelos em dois dos três loci. Nenhum dos pares de irmãos concordantes afetados compartilhava alelos em apenas um ou em nenhum dos loci (Fig. 15.5). O modelo mais provável para explicar estas observações é que alguns alelos de *RET*, o locus cromossômico 3p21, e o locus cromossômicos 19q12 conferem alguma suscetibilidade à HDCR, mas não causam a doença por si. A HSCR é uma doença multifatorial que resulta dos efeitos aditivos de alelos de suscetibilidade em vários loci. Assim, os mecanismos genéticos subjacentes para esta malformação congênita relativamente bem definida mostraram-se surpreendentemente complexos. É provável, no entanto, que eles sejam mais simples que os mecanismos envolvidos em doenças complexas mais comuns, tais como a diabetes.

Diabetes Melito

Existem dois tipos principais de diabetes melito: **tipo 1 (insulino-dependente)** e **tipo 2 (não-insulino-dependente)**, que representam cerca de 10% e 88% de todos os casos, respectivamente. Estes dois tipos diferem na idade típica de início, na concordância em gêmeos MZ e nas associações a HLA. A agregação familiar é vista em ambos os tipos de diabetes, mas, em qualquer família, geralmente vemos ou o tipo 1 ou o tipo 2, mas não ambos.

Diabetes Melito Tipo 1

A diabetes melito tipo 1 tem uma incidência na população caucasiana de cerca de 1 em 200 (0,5%) e em geral se manifesta na infância ou na adolescência. Ela resulta de uma destruição autoimue das células β do pâncreas, que normalmente produzem insulina.

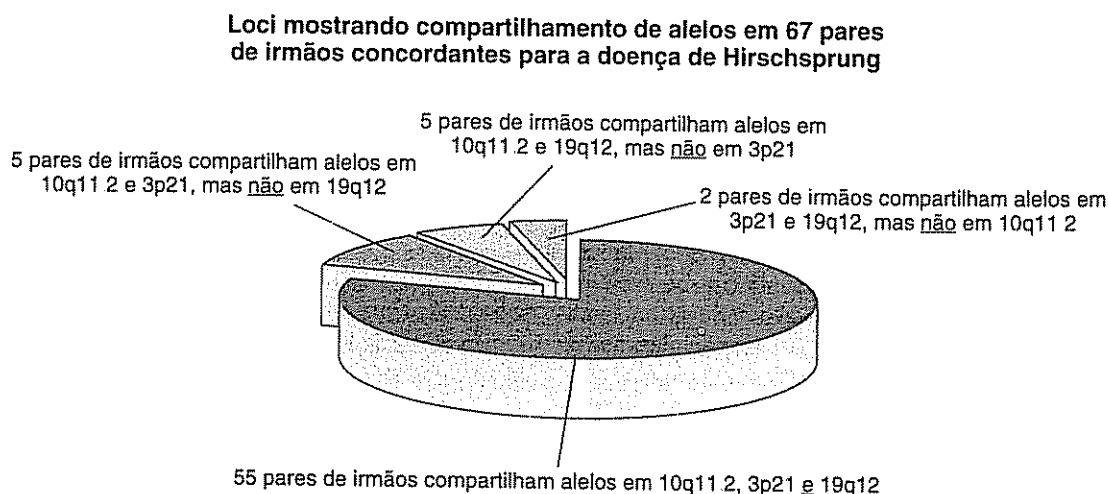



Fig. 15.5 Diagrama circular de concordância em 67 pares de irmãos concordantes para a doença de Hirschsprung, dividido de acordo com o número de loci para os quais os irmãos mostram compartilhamento de alelos. Os três loci estão situados em 10q11.2 (RET), 3p21 e 19q12. (Dados fornecidos por A. Chakravarti, Johns Hopkins University, Baltimore.)

Associação de MHC na Diabetes Tipo 1. Os fatores genéticos apenas não causam a diabetes tipo 1, pois a taxa de concordância nos gêmeos MZ para a diabetes tipo 1 é de apenas cerca de 40%. Entretanto, há uma forte evidência de fatores genéticos entre os gêmeos MZ concordantes para a diabetes tipo 1, que excede em muito a concordância nos gêmeos DZ, e o risco para a diabetes tipo 1 em irmãos de um probando afetado é de cerca de 6%, resultando em uma estimativa de λ_s = 6%/0,5% = 12. Soube-se que o locus MHC era o principal fator genético na diabetes tipo 1 quando um estudo de associação revelou que cerca de 95% de todos os pacientes com diabetes tipo 1 (em comparação com cerca de metade da população normal) são homozigotos para *HLA-DR3* ou *HLA-DR4*. Os heterozigotos *DR3/DR4* são particularmente suscetíveis à diabetes tipo 1. Esta é uma das mais fortes associações conhecidas entre MHC e doença (ver Cap. 14).

Como a destruição das células β responsável pela diabetes tipo 1 parece ser um processo auto-imune, faz sentido que exista uma associação entre alguns alelos (*DR3* e *DR4*) em um locus conhecido como regulador da resposta imune e propensão à doença auto-imune. Outros dados sobre os mecanismos subjacentes à associação de *DR3* e *DR4* com a diabetes tipo 1 vieram da análise molecular de diferentes haplótipos *DR* contendo vários alelos dos genes de HLA classe II, especialmente *DQ* (ver Cap. 14). A presença de ácido aspártico (Asp) na posição 57 da cadeia *DQ* (ver Fig. 14.1) está fortemente associada à resistência à diabetes tipo 1, enquanto outros aminoácidos nesta posição (alanina, valina ou serina) conferem suscetibilidade. Cerca de 90% dos pacientes com diabetes tipo 1 são homozigotos para os genes *DQ*β que não codificam Asp na posição 57. Considerando que a molécula *DQ*, e a posição 57 da cadeia β em particular, é crucial para a ligação do antígeno peptídico e apresentação às células T para resposta, é muito provável que a molécula *DQ*, em especial o aminoácido 57 de sua cadeia β, contribua diretamente para a resposta auto-imune que destrói as células do pâncreas produtoras de insulina.

Outros Genes Que Não os Loci de MHC Classe 1 na Diabetes Tipo 1. Os estudos familiares na diabetes tipo 1 (Quadro 15.5) sugerem que mesmo quando os irmãos compartilham os mesmos haplótipos *DR*, o risco de doença é de cerca de 13%, ainda bem abaixo da taxa de concordância nos gêmeos MZ, de cerca de 40%. Esta discrepância indica que o haplótipo de MHC sozinho contribui com apenas um terço (13%/40%) da contribuição genética para o risco de diabetes tipo 1 em irmãos do probando. Assim, devem existir outros genes, em outras partes do genoma, que também predispõem ao desenvolvimento da diabetes tipo 1, supondo-se que os gêmeos MZ e os irmãos tenham exposições ambientais similares. Achar estes genes de predisposição é a meta de grandes estudos de mapeamento que estão usando os métodos de ligação livre de modelo para pares de irmãos (já descritos em outra parte deste capítulo), de modo a vasculhar o genoma. Foram propostos até 13 loci para a diabetes tipo 1 com base em amplas triagens do genoma. Destes, a melhor evidência é para um locus de sensibilidade situado, ou próximo, em um número variável de polimorfismo de repetições em tandem (ver Cap. 6) no próprio promotor do gene de insulina. A identificação de outros genes de suscetibilidade para a diabetes tipo 1, tanto dentro quanto fora do MHC, permanece alvo de intensas investigações. No momento, a natureza de fatores de risco não-genéticos na diabetes tipo 1 é amplamente desconhecida.

QUADRO 15-5

Risco de Diabetes Tipo 1 em Irmãos de Probandos com Diabetes Tipo 1

Extensão de Haplótipos de MHC Compartilhados	Risco de Diabetes Tipo 1 em Irmão de Paciente com Diabetes Tipo 1 (%)
Probando e irmão compartilham *DR3/DR4*	20
Probando e irmão compartilham quaisquer dois haplótipos	13
Probando e irmão compartilham qualquer um haplótipo	5
Probando e irmão não compartilham nenhum haplótipo	2

MHC = Complexo principal de histocompatibilidade.

Doença de Alzheimer

A **AD** é uma doença neurodegenerativa que afeta de 1% a 2% da população dos EUA. Os pacientes têm uma perda progressiva crônica de memória e outras funções intelectuais, associada à morte dos neurônios e ao desenvolvimento de agregados proteicos extracelulares chamados de placas amilóides pelo córtex cerebral. O constituinte mais importante destas placas é um pequeno peptídeo (de 39 a 42 aminoácidos), Aβ, derivado de uma clivagem de uma proteína neuronal normal, o precursor da proteína amilóide. A estrutura secundária de Aβ dá às placas as características de coloração das proteínas amilóides (ver também o Cap. 12). Além das três formas raras autossômicas dominantes da doença (ver Quadro 12.10), nas quais o início da doença é entre a terceira e a quinta década de vida, há uma forma comum de AD com início após os 60 anos (manifestação tardia). Esta forma não tem um padrão de herança mendeliano óbvio, mas apresenta agregação familiar e um risco relativo elevado (λ_r) típico dos distúrbios com herança complexa.

O alelo $\varepsilon 4$ de apolipoproteína E. O primeiro fator genético significativamente associado à AD comum de manifestação tardia é o locus de **apolipoproteína E** *(APOE)*. ApoE é uma proteína componente da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e está envolvida na depuração de LDL por uma interação com receptores de alta afinidade no fígado. A apoE também é um constituinte das placas amilóides na AD e é conhecida como se ligando ao peptídeo Aβ. O gene *APOE* está no cromossomo 19 e tem três alelos, $\varepsilon 2$, $\varepsilon 3$ e $\varepsilon 4$, devidos a substituições de arginina por duas cisteínas diferentes na proteína.

A análise de ligação livre de modelo em pares de irmãos concordantes para AD inicialmente revelou um excesso de compartilhamento de alelos em uma região do cromossomo 19 que inclui o locus para apoE. Tendo em mente este resultado, foi feito um estudo de associação entre os alelos *APOE* e AD em pacientes AD *versus* controles apropriadamente ajustados por idade, gênero e etnicidade. Quando a freqüência dos genótipos $\varepsilon 2$, $\varepsilon 3$ e $\varepsilon 4$ foi comparada com a freqüência de genótipos sem $\varepsilon 4$ nos pacientes com AD, encontrou-se um genótipo com pelo menos um alelo $\varepsilon 4$ com uma freqüência de duas a três vezes maior entre os pacientes comparados com os controles (Quadro 15.6) tanto na população geral dos EUA quanto na japonesa. Parece haver menos associação entre as populações hispânicas e afro-americanas. Ainda mais marcante é que o risco de AD parece aumentar à medida que o número de alelos $\varepsilon 4$ aumenta, por um efeito de idade de início: quanto mais alelos $\varepsilon 4$ uma pessoa tem, mais cedo é o início da AD. Em um estudo de pacientes com AD e

QUADRO 15–6

Associação do Alelo *APOE* ε4 com a Doença de Alzheimer: Freqüência de Genótipos com e sem o Alelo ε4 entre os Pacientes AD e Controles dos EUA e Japão

Genótipo	Freqüência			
	AD (EUA)	*Controle (EUA)*	*AD (Japão)*	*(Controle) (Japão)*
ε4/ε4; *ε4/ε3* ou *ε4/ε2*	0,64	0,31	0,47	0,17
ε3/ε3; *ε2/ε3*; ou *ε2/ε2*	0,36	0,69	0,53	0,83

AD = doença de Alzheimer.

tanto não-parentes quanto familiares não-afetados no grupo controle (Fig. 15.6), a idade em que a AD se desenvolveu nos pacientes afetados era mais cedo para os homozigotos ε4/ε4, em seguida para os heterozigotos ε4/ε3 e significativamente menor para os outros genótipos.

Na população em geral, o alelo ε4 é claramente um fator de predisposição que aumenta o risco de desenvolvimento de AD mudando a idade de início para uma idade mais cedo, de modo que a doença torna-se evidente antes da maioria dos pacientes morrer por outras doenças que ameaçam a vida dos idosos. A despeito deste risco aumentado, outros fatores genéticos e ambientais devem ser importantes, pois muitos homozigotos ε4/ε4 vivem até uma idade avançada sem nenhuma evidência de AD e de 50% a 75% de todos os heterozigotos portadores de um alelo ε4 nunca desenvolvem AD. Um papel para outros genes recebeu mais apoio das análises de ligação livre de modelo em pares

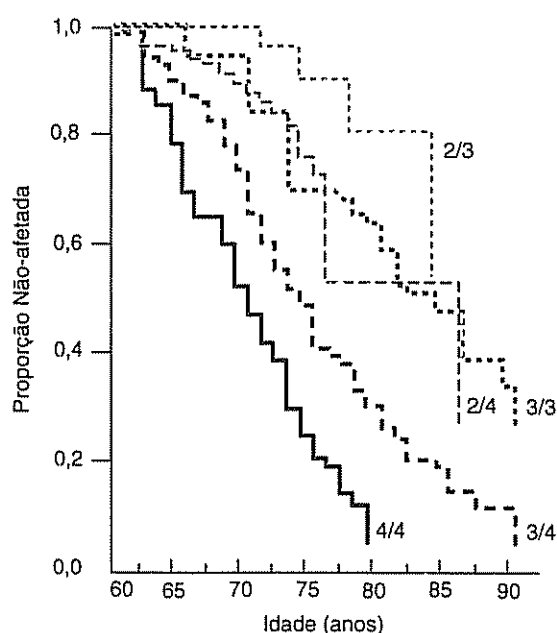



Fig. 15.6 Chance de permanecer sem ser afetado pela doença de Alzheimer como uma função da idade para genótipos *APOE* diferentes. Em um extremo está o homozigoto *ε4/ε4*, que tem menos de 10% de chance de permanecer livre da doença aos 80 anos, enquanto um heterozigoto *ε2/ε3* tem uma chance de mais de 90% de permanecer livre da doença aos 80 anos. (Modificado com permissão de Strittmatter W J, Roses A D [1996] Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci 19:53-77 © 1996, de Annual Reviews.)

de irmãos afetados por AD quando foi encontrada uma região com elevado compartilhamento de alelos no cromossomo 12. Também existe uma associação entre a presença do alelo ε4 e a doença neurodegenerativa após danos cefálicos (como visto nos boxeadores profissionais), o que indica que pelo menos um fator ambiental interage com o alelo ε4 na patogenia da doença neurodegenerativa. Assim, a variante ε4 de *APOE* representa um exemplo importante de um alelo de predisposição: ele predispõe a uma característica complexa de um modo poderoso, mas não predestina uma pessoa portadora do alelo a desenvolver a doença. Genes adicionais, bem como efeitos ambientais, também estão claramente envolvidos, mas permanecem por ser esclarecidos de modo definitivo. Os testes de pessoas assintomáticas quanto ao alelo ε4 permanecem controversos, pois saber que uma pessoa é heterozigota ou homozigota para o alelo ε4 não significa que ela vá desenvolver AD e não há nenhuma intervenção atualmente conhecida que possa afetar a chance de que a pessoa desenvolva ou não AD (ver os Caps. 12 e 20).

Malformações Congênitas Multifatoriais

Várias malformações congênitas comuns, que ocorrem como defeitos isolados e não como parte de uma síndrome, parecem reincidir nas famílias. A agregação familiar e o risco elevado de recorrência em parentes de uma pessoa afetada são peculiares a uma característica complexa (Quadro 15.7). Algumas das malformações congênitas mais importantes com herança complexa são os **defeitos de tubo neural, fenda labial** com ou sem **palato fendido** e **malformações cardíacas**.

Defeitos de Tubo Neural

A **anencefalia** e a **espinha bífida** são defeitos de tubo neural (NTDs) que freqüentemente ocorrem juntas nas famílias e são consideradas como tendo uma patogenia comum (Fig. 15.7). Na

QUADRO 15–7

Algumas Malformações Congênitas Comuns com Herança Multifatorial

Malformação	Incidência Populacional (por 1.000) (aproximada)
Fenda labial com/sem fenda palatina	0,4-1,7
Fenda palatina	0,4
Deslocamento congênito do quadril	2*
Defeito cardíaco congênito	4-8
Defeito de septo ventricular	1,7
Ducto arterial aberto	0,5
Defeito de septo atrial	1,0
Estenose aórtica	0,5
Defeitos de tubo neural	2-10
Anencefalia	Variável
Espinha bífida	Variável
Estenose pilórica	1† 5*

*Por 1.000 homens; †por 1.000 mulheres

Nota: Muitos destes distúrbios são heterogêneos e em geral, mas não invariavelmente são multifatoriais.

Dados de Carter C O (1976) Genetics of common single malformations. Br Med Bull 32:21-26; Nora J J (1968) Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases: The genetic environmental interaction. Circulation 38:604-617; Lin A E, Garver K.L (1988) Genetic counseling for congenital heart defects. J Pediatr 113:1105-1109.

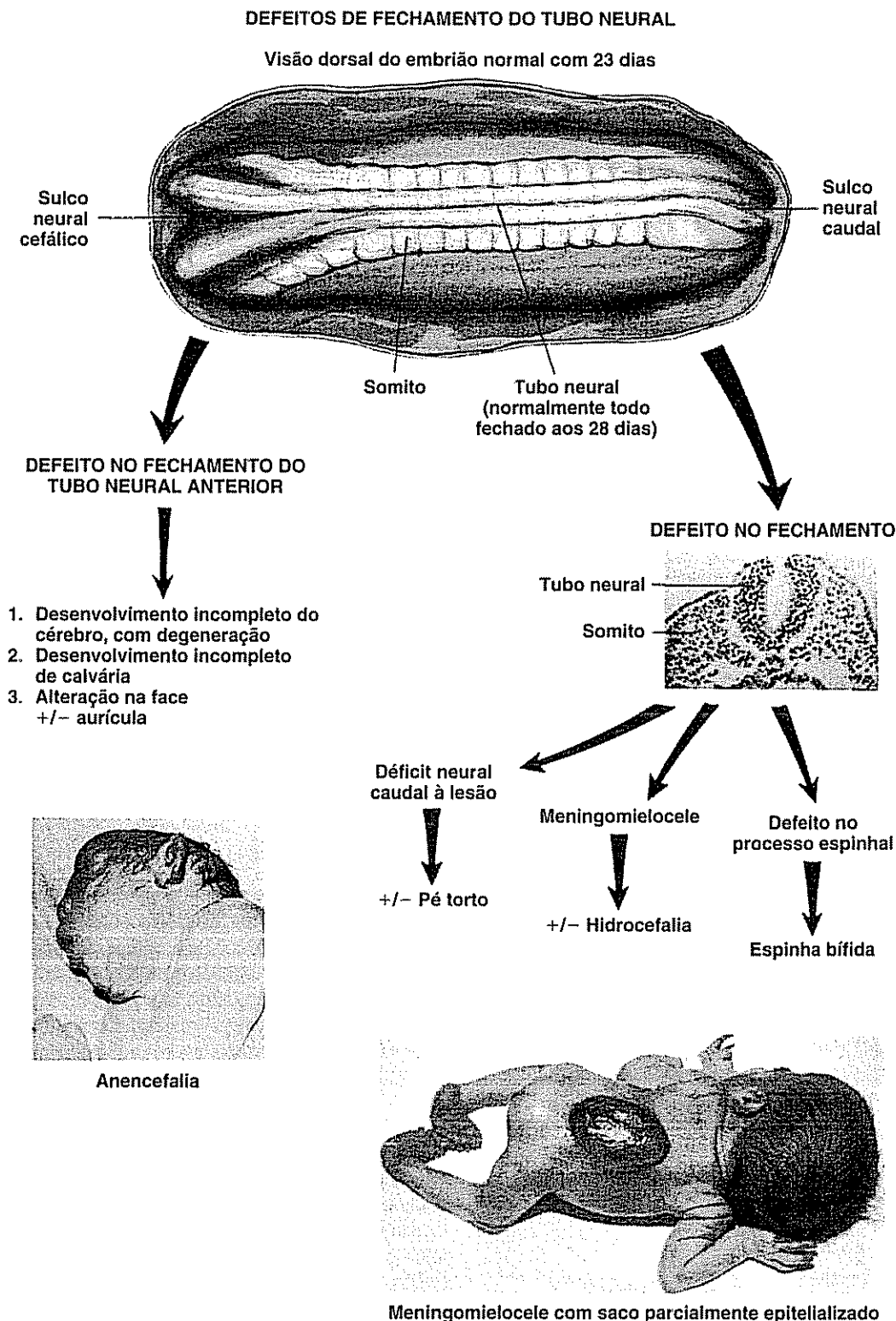



Fig. 15.7 A origem dos defeitos de tubo neural anencefalia e espinha bífida (De Jones K L [1988] Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. 4ª ed WB Saunders, Philadelphia)

anencefalia, o prosencéfalo, as meninges, a abóbada craniana e a pele estão todas ausentes. Muitas crianças com anencefalia são natimortos, e os que nascem vivos sobrevivem apenas algumas horas. Cerca de dois terços das crianças afetadas são meninas. Na espinha bífida, há uma falta de fusão dos arcos das vértebras, tipicamente na região lombar. Existem graus variados de gravidade, indo desde a espinha bífida oculta, na qual o defeito é apenas no arco ossificado, até a espinha bífida aberta, na qual o defeito ósseo também está associado à meningocele (protrusão das meninges) ou à meningomielocele (protrusão de elementos neurais, bem como das meninges, no defeito; ver Fig. 15.7).

Como um grupo, os NTDs são uma causa líder de natimortos, morte no início da lactância e danos nas crianças que sobrevivem. Sua incidência ao nascimento é variável, indo de quase

1% na Irlanda até 0,2% ou menos nos EUA. A freqüência também parece variar com fatores sociais e sazonais ao nascimento e oscila muito amplamente com o tempo (com um aumento acentuado nos últimos anos; ver discussão mais adiante).

Uma pequena proporção de NTDs tem causas específicas: por exemplo, as bridas amnióticas (conexões fibrosas entre o âmnio e o feto causadas pelo rompimento precoce do âmnio, que podem perturbar estruturas durante seu desenvolvimento embriológico), alguns defeitos monogênicos com expressão pleiotrópica, alguns distúrbios cromossômicos e alguns teratógenos. A maioria dos NTDs, entretanto, é de defeitos isolados.

Deficiência Materna de Ácido Fólico e Defeitos de Tubo Neural. Há muito acreditava-se que os NTDs seguiam um padrão de herança multifatorial determinada por fatores ambientais e genéticos múltiplos. Assim, foi uma descoberta surpreendente ver que o maior fator único causal dos NTDs é uma deficiência vitamínica. Descobriu-se que o risco de NTDs estava inversamente correlacionado aos níveis do soro materno de ácido fólico durante a gestação, com um limiar de 200 μg/l, abaixo do qual o risco de NTD torna-se muito significativo. Juntamente com os níveis reduzidos de folato sérico, níveis elevados de homocisteína também foram vistos em mães de crianças com NTDs, o que sugeria que uma anomalia bioquímica estava ocorrendo na etapa de reciclagem de tetraidrofolato em metilato homocisteína e em metionina (Fig. 15.8). Os níveis de ácido fólico são fortemente influenciados pela ingestão dietética e podem diminuir durante a gestação mesmo com uma ingestão típica de cerca de 230 μg/dia. O impacto da deficiência de ácido fólico é exacerbado por uma variante genética da enzima 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), criada por uma mutação de sentido trocado comum que torna a enzima menos estável que o normal. A instabilidade desta enzima impede a reciclagem de tetraidrofolato e interfere na metilação de homocisteína em metionina. O alelo mutante é tão comum em muitas populações que entre 5% e 15% da população é homozigota para a mutação. Nos estudos de crianças com NTDs e suas mães, observou-se que as mães de crianças com NTDs tinham o dobro da chance de ser homozigotas para o alelo mutante que codifica a enzima instável que as controle. Nem todas as mães de crianças com NTD com baixos níveis de ácido fólico são homozigotas para o alelo mutante de MTHFR, entretanto, o que indica que baixos níveis de ácido fólico podem ser causados por outros fatores genéticos desconhecidos ou apenas por deficiência dietética. Como este defeito enzimático contribui para os NTDs e se a anomalia é um resultado direto de níveis elevados de homocisteína, níveis diminuídos de metionina ou algum outro distúrbio metabólico ainda não sabemos.

Fig. 15.8 Via metabólica de reciclagem de ácido fólico, um doador de um carbono usado para gerar metionina a partir da homocisteína.

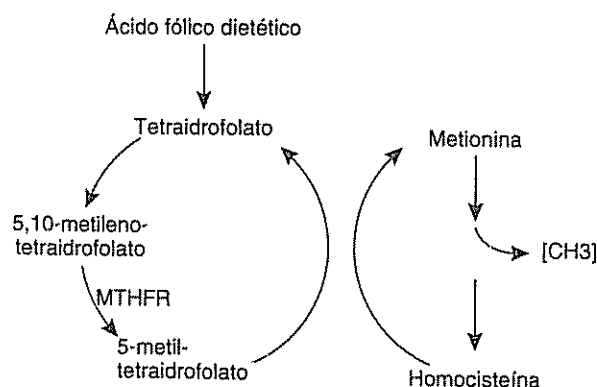
Prevenção dos Defeitos de Tubo Neural. A descoberta da deficiência de ácido fólico nos NTDs levou a uma intensa iniciativa da saúde pública no sentido de educar as mulheres para que suplementassem suas dietas com ácido fólico 1 mês antes da concepção e continuassem esta suplementação por 2 meses após a concepção durante o período em que se forma o tubo neural. Demonstrou-se que a suplementação dietética com 400 a 800 μg de ácido fólico/dia para uma mulher que planeja suas gestações reduzia a incidência de NTDs em mais de 75%. No momento, discute-se intensamente se todo o suprimento de alimento deve ser suplementado com ácido fólico, como uma medida de saúde pública, para evitar o problema das mulheres não conseguirem suplementar individualmente suas dietas durante a gestação.

Os pais de crianças com NTD correm um risco aumentado de recorrência em futuras gestações. Os riscos de recorrência dentro das famílias são dados no Quadro 15.8. Os NTDs também têm alta cotação nas condições para as quais é possível um diagnóstico pré-natal. A anencefalia e a maioria dos casos de espinha bífida podem ser identificados na fase pré-natal pela detecção de níveis excessivos de **alfa-fetoproteína** (AFP) e outras substâncias fetais no líquido amniótico e por **varredura de ultra-som** (ver Cap. 18 para maior discussão). Menos de 5% de todos os pacientes com NTDs nascem de mulheres com filhos previamente afetados. Por este motivo, a triagem de todas as grávidas para NTD usando dosagens de AFP e outras substâncias fetais no soro materno está se tornando mais generalizada. Assim, podemos antecipar que uma combinação de ácido fólico preventivo e a triagem de AFP materna fornecerão importantes benefícios de saúde pública, pois reduzirão drasticamente a incidência de NTDs.

Defeitos Cardíacos Congênitos

Os defeitos cardíacos congênitos (CHDs) são muito comuns, com uma freqüência de cerca de quatro a oito casos/1.000 nascimentos. Eles formam um grupo heterogêneo, causado em alguns casos por mecanismos monogênicos ou cromossômicos e, em outros, pela exposição a teratógenos, tais como infecção por rubéola ou diabetes materna. A causa em geral é desconhecida, e a maioria dos casos é tida como de origem multifatorial.

Existem muitos tipos de CHDs, com diferentes incidências populacionais e riscos empíricos. Sabemos que quando os defeitos cardíacos reincidem em uma família, entretanto, a criança afetada não tem necessariamente o mesmo defeito anatômico, mas apresenta recorrência de lesões que são similares com relação aos mecanismos desenvolvimentais. Usando o mecanismo desenvolvimental com um esquema de classificação, pode-se distinguir cinco grupos principais de CHD: lesões de fluxo, defeitos na migração celular ou na morte celular, anomalias na matriz extracelular e defeitos no crescimento-alvo. Um padrão familiar é encontrado principalmente no grupo com lesões de fluxo, uma grande categoria que inclui a síndrome do coração esquerdo hipoplásico, a coartação da aorta, o defeito do septo atrial do tipo *secundum*, a estenose valvar pulmonar, um tipo comum de defeito do septo ventricular e outras formas. Alguns destes padrões familiares são explicáveis por deleção na região cromossômica 22q11, como visto na **síndrome velocardiofacial** associada à tetralogia de Fallot e outras lesões de fluxo (ver Cap. 10).

Os CHDs isolados são herdados como características multifatoriais? As proporções de risco relativo para irmãos, λ_s, para lesões de

QUADRO 15–8

Riscos de Recorrência (%) para Fenda Labial com ou sem Palato Fendido e para Malformações de Tubo Neural

Parentes Afetados	Fenda Labial com/sem Palato Fendido	Anencefalia e Espinha Bífida
Sem irmãos		
Nenhum dos genitores	0,1	0,3
Um genitor	3	4,5
Ambos os genitores	34	30
Um irmão		
Nenhum dos genitores	3	4
Um genitor	11	12
Ambos os genitores	40	38
Dois irmãos		
Nenhum dos genitores	8	10
Um genitor	19	20
Ambos os genitores	45	43
Um irmão e um parente em 2.° grau		
Nenhum dos genitores	6	7
Um genitor	16	18
Ambos os genitores	43	42
Um irmão e um parente em 3.° grau		
Nenhum dos genitores	4	5,5
Um genitor	14	16
Ambos os genitores	44	42

De Bonaiti-Pellié C., Smith C (1974) Risk tables for genetic counselling in some common congenital malformations J Med Genet 11:374-377.

fluxo apóiam a agregação familiar para esta classe de CHD (Quadro 15.9). Até que saibamos mais, os dados conhecidos podem ser usados como estimativas do risco de recorrência para lesões de fluxo nos parentes em primeiro grau. Há, no entanto, uma rápida diminuição de risco (para níveis que não ultrapassam o risco populacional) em parentes de segundo e terceiro grau de pacientes-índice com lesões de fluxo. De modo similar, os parentes de pacientes-índice com tipos de CHDs que não as lesões de fluxo podem receber uma garantia de que seu risco não é maior que o da população em geral. Para uma maior garantia, hoje muitos CHDs podem ser avaliados na fase pré-natal por ultra-sonografia (ver Cap. 18).

Fenda Labial e Palato Fendido

A fenda labial com ou sem palato fendido, ou CL(P), é uma das malformações congênitas mais comuns. A CL(P), que é etiologicamente distinta da fenda palatina isolada sem lábio fendido, origina-se como uma falha de fusão do processo frontal com o processo maxilar por volta do 35.° dia de gestação. Cerca de 60% a 80% dos afetados são meninos. A CL(P) é heterogênea e inclui formas monogênicas isoladas, várias síndromes monogênicas, formas associadas a distúrbios cromossômicos (especialmente a trissomia do 13), casos resultantes de exposição a teratógenos (embriopatia de rubéola, talidomida ou anticonvulsivos) e formas que aparecem em síndromes não-familiares. No passado, quase todos os modos de herança concebíveis haviam sido propostos para a CL(P) para explicar seu padrão complexo de herança.

Há uma variação considerável na freqüência em grupos raciais diferentes: cerca de 1,7 por 1.000 nos japoneses, 1 por 1.000 nos caucasianos e 0,4 por 1.000 nos afro-americanos. Taxas relativamente altas também são vistas em algumas populações norte-americanas de descendência asiática, em índios do sudeste dos EUA e da costa oeste do Canadá. A taxa de concordância é de cerca de 30% nos gêmeos MZ e de cerca de 5% (o mesmo risco dos irmãos que não são gêmeos) nos gêmeos DZ (ver Quadro 15.4).

Uma das previsões da herança complexa é que o risco de recorrência em parentes de probandos que são gravemente afetados é maior que o risco para parentes de probandos afetados de uma forma branda. A explicação para este fenômeno é que a doença mais grave indica uma maior carga de alelos de predisposição para a doença na família. Em concordância com isto, os estudos familiares de CL(P) mostraram um aumento no risco de recorrência com a gravidade, de unilateral para bilateral e de fenda labial apenas (CL) para fenda labial com palato fendido (CLP). Até que se tenha uma melhor compreensão sobre a base destas anomalias, entretanto, os dados de risco empírico (ver Quadros 15.8, 15.10 e 15.11) são as únicas orientações disponíveis para a informação genética.

Doença Arterial Coronariana

A doença arterial coronariana (CAD) mata 500.000 pessoas por ano nos EUA e é a número 1 em causar morbidade e mortalidade no mundo desenvolvido. A CAD devida à aterosclerose é a principal causa de quase 1.500.000 casos de infarto do miocárdio (MI) que ocorrem anualmente. No conjunto, a CAD custa mais de US$100 bilhões em despesas de cuidados de saúde e perda de produtividade a cada ano nos EUA. Os estudos de famílias e gêmeos têm apoiado repetidamente um papel da hereditariedade no MI que ocorre em grupos etários mais jovens. Por exemplo, um estudo de 21.004 gêmeos na Suécia revelou que, após controlar os fatores de risco, tais como a diabetes, o fumo e a hipertensão, se um gêmeo masculino sofreu um MI antes dos 65 anos, o risco do outro gêmeo para MI aumentou de seis a oito vezes no caso dos MZ e o triplo nos gêmeos DZ. Entre as gêmeas, o aumento de risco para MI em gêmeas MZ comparado com o risco para as DZ era ainda maior: 15 vezes para uma gêmea MZ e apenas 2,6 vezes para uma gêmea DZ, quando uma das gêmeas tinha um MI antes dos 65 anos. Quanto mais idoso o primeiro gêmeo na época do MI, menor o

QUADRO 15–9

Incidência Populacional e Riscos de Recorrência para Várias Lesões de Fluxo

Defeito	Incidência Populacional (%)	Freqüência em Irmãos (%)	$\lambda_{irmão}$
Defeito de septo ventricular	0,17	4,3	25
Ducto arterial aberto	0,083	3,2	38
Defeito de septo atrial	0,066	3,2	48
Estenose aórtica	0,044	2,6	59

QUADRO 15–10

Riscos Empíricos de Fenda Labial com/sem Palato Fendido em Parentes de Probandos Afetados

População Afetada	Incidência de Fenda Labial com/sem Palato Fendido (%)	$\lambda_{parente}$
População geral	0,1	–
Parentes em primeiro grau	4,0	40
Parentes em segundo grau	0,7	7
Parentes em terceiro grau	0,3	3

QUADRO 15–11

Risco de Fenda Labial com/sem Palato Fendido em Irmãos de Probando Afetado com Fendas de Gravidade Crescente

Fenótipo do Probando	Incidência em Irmãos de Fenda Labial com/sem Palato Fendido (%)
Fenda labial unilateral sem palato fendido	4,0
Fenda palatina e labial unilateral	4,9
Fenda labial bilateral sem palato fendido	6,7
Fenda labial bilateral e palatina	8,0

aumento de risco para o outro gêmeo Assim, quanto mais jovem a pessoa, mais importantes são os fatores genéticos de MI, particularmente para as mulheres.

Existem muitos estágios na evolução das lesões ateroscleróticas na artéria coronariana nos quais as diferenças genéticas podem predispor ou proteger da CAD. O que começa como uma faixa gordurosa na íntima da artéria evolui para uma placa contendo músculo liso, lipídio e tecido fibroso. Estas placas da íntima tornam-se vasculares e podem sangrar, ulcerar e calcificar, causando, então, um grave estreitamento do vaso, bem como servindo como um solo fértil para a trombose que resulta em oclusão total súbita e MI. Um grande número de genes e produtos gênicos foram sugeridos e, em alguns casos, implicados em promover um ou mais dos estágios de desenvolvimento da CAD. Eles incluem genes que codificam proteínas envolvidas no seguinte:

1. Transporte e metabolismo de lipídios séricos (apoE, C-III, o receptor de LDL e a lipoproteína[a]), bem como o nível total de colesterol, que, por si só, é uma característica quantitativa com uma substancial herdabilidade;
2. Vasoatividade, tal como enzima conversora de angiotensina;
3. Coagulação sanguínea, adesão plaquetária e fibrinólise, tais como o inibidor-1 de ativador de plasminogênio e as glicoproteínas Ib e IIIa de superfície de plaqueta.

A hipercolesterolemia familiar, um defeito autossômico dominante do receptor de LDL discutido no Cap. 12, contribui com cerca de 5% dos sobreviventes do MI. Embora existam outras causas monogênicas, a maioria dos casos de CAD é tida como apresentando herança multifatorial, com fatores de predisposição tanto genéticos quanto não-genéticos.

Os fatores de risco para a CAD incluem vários outros distúrbios multifatoriais com componentes genéticos: hipertensão, obesidade e diabetes melito. Neste contexto, os distúrbios metabólicos e fisiológicos representados por estes problemas também contribuem para aumentar o risco de CAD.

Uma característica da CAD que é compatível com a herança multifatorial é que, embora os homens tenham um risco mais alto de morte por MI tanto na população quanto dentro das famílias afetadas, o risco de recorrência em parentes é um pouco maior quando o probando é feminino ou quando ele é jovem, ou ambos. Este risco aumentado sugere que há uma carga maior de alelos que predispõem ao MI na família, aumentando, assim, o risco da doença nos parentes do probando.

A CAD em geral é um achado incidental na história familiar de pacientes com outras doenças genéticas. Em vista do alto risco de recorrência, os médicos e consultores genéticos precisam considerar se os parentes em primeiro grau de pacientes com CAD devem ser avaliados melhor e receber informação genética, mesmo quando a CAD não é o principal problema genético pelo qual o paciente ou o parente foi encaminhado.

Consulta Genética de Famílias de Pacientes com Características Multifatoriais

Os mecanismos subjacentes pelos quais os genes e o ambiente interagem para causar doenças com herança complexa são amplamente desconhecidos. Para uma consulta genética, dependemos da avaliação dos riscos de recorrência em coleções de famílias para obter **estimativas empíricas** médias dos riscos de recorrência. Logicamente, o risco real para uma determinada família pode ser maior ou menor que a média. No momento, estes riscos empíricos baseados na população, embora em geral inadequados, são a única fonte disponível para a previsão genética. Entretanto, alguns princípios gerais devem ser considerados quando se dá uma consulta genética para distúrbios multifatoriais.

1. O risco de recorrência é muito maior para parentes em primeiro grau de membros familiares afetados que para parentes mais distantes.
2. A melhor estimativa do risco de recorrência é o risco empírico, que é simplesmente o risco de recorrência, observado em famílias similares, para um parente com o mesmo grau de parentesco. Em geral é útil dar o risco empírico como um múltiplo do risco da população para o defeito. O risco empírico é totalmente baseado em experiências anteriores e não significa que os fatores genéticos e ambientais na patogenia da malformação sejam compreendidos. Um risco empírico é uma média para a população e não é necessariamente preciso para uma família específica.
3. O risco de recorrência é aumentado por:
   a. presença de mais de um parente afetado;
   b. uma forma grave ou o início precoce do distúrbio;
   c. uma pessoa afetada do sexo menos provavelmente afetado;
   d. parentesco consangüíneo.
4. Dois erros comuns no cálculo de risco devem ser evitados:
   a. Se o genitor de uma criança com um defeito de nascimento multifatorial tem outro filho com um cônjuge diferente, as crianças são parentes em segundo grau, não em primeiro grau, e o risco empírico para o segundo filho é muito menor que se a criança tivesse ambos os genitores em comum (em geral, o risco é de cerca de 1% em vez de cerca de 5%).
   b. Quando um tio ou tia afetado de uma criança com um defeito multifatorial pergunta sobre o risco do mesmo defeito em sua prole, o risco relevante não é o risco para a tia ou o tio (um parente em segundo grau do probando), mas o risco para a prole da tia ou tio (um parente em terceiro grau).

CONCLUSÃO

As doenças herdadas como características complexas representam um dos maiores desafios enfrentados pelos geneticistas hoje em dia. Muitas destas doenças são comuns e causam morbidade e mortalidade substanciais. As famílias e os pacientes que lidam com estas doenças precisam de uma consulta genética precisa, envolvendo os riscos de recorrência nos parentes e na prole das pessoas afetadas. Entretanto, nossa capacidade de fornecer tal consulta é muito prejudicada por nossa falta de conhecimento do número de genes, da natureza dos alelos variantes e dos mecanismos subjacentes de como estes alelos variantes contribuem para a causa ou predisposição para a doença. As doenças com herança complexa estão sendo ativamente estudadas, e muito se tem aprendido. Esperamos que à medida que as informações que estão sendo obtidas pelo Projeto do Genoma Humano forem sendo aplicadas ao problema das doenças com herança complexa, os médicos e consultores genéticos nos próximos anos tenham a informação de que precisam para dar um diagnóstico molecular preciso e avaliar os riscos para um crescente número destas doenças.

Referências Gerais

King RA, Rotter JI, Motulsky AG (1992) The Genetic Basis of Common Diseases. Oxford University Press, Oxford, England

Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (1997) Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics, 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ, et al (1995) A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Nature 377:150-151.

Foy CA, Grant PJ (1997) Genes and the development of vascular disease. Postgrad Med J 73:271-278.

Hawkes CH (1997) Twin studies in medicine—what do they tell us? Q J Med 90:311-321.

Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science 264:1604-1608.

Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet 11:241-247.

Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. Science 265:2037-2048.

Lin AE, Garver KL (1988) Genetic counseling for congenital heart defects. J Pediatr 113:1105-1109.

Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, et al (1994) Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. N Engl J Med 330:1041-1046.

Martinelli I, Sacchi E, Landi G, et al (1998) High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives N Engl J Med 38:1793-1797.

Mein CA, Esposito L, Dunn MG, et al (1998) A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. Nat Genet 19:297-300.

Peyser PA (1997) Genetic epidemiology of coronary artery disease. Epidemiol Rev 19:80-90.

Risch N (1990) Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. Am J Hum Genet 46:222-228.

Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. Science 273:1516-1517.

Risch N, Zhang H (1995) Extreme discordant sib pairs for mapping quantitative trait loci in humans. Science 268:1584-1589.

Strittmatter WJ, Roses AD (1996) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. Annu Rev Neurosci 19:53-77.

Todd JA, Bell JI, McDevitt HO (1988) A molecular basis for genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. Trends Genet 4:129-134.

Tsuang MT (1998) Recent advances in genetic research on schizophrenia. J Biomed Sci 5:28-30.

Problemas

1. Para uma determinada malformação, o risco de recorrência em irmãos e prole das pessoas afetadas é de 10%, o risco para sobrinhas e sobrinhos é de 5% e o risco para primos em primeiro grau é de 2,5%.
   (a) É mais provável que a malformação tenha uma característica autossômica dominante com penetrância reduzida ou uma característica multifatorial? Explique.
   (b) Que outra informação pode apoiar sua conclusão?

2. Uma grande diferença de sexo em pessoas afetadas em geral é um indício de herança ligada ao X. Como você estabeleceria que a estenose pilórica é multifatorial e não ligada ao X?

3. Uma série de crianças com uma determinada malformação congênita inclui tanto meninos quanto meninas. Em todos os casos, os genitores são normais. Como você determina se é mais provável que a malformação seja multifatorial que autossômica recessiva?

Genética e Câncer

O câncer é uma das doenças mais comuns e graves vistas na medicina clínica. As estatísticas mostram que algumas formas de câncer atacam mais de um terço da população e contribuem com mais de 20% de todas as mortes, sendo a doença responsável por mais de 10% do custo total com cuidados médicos nos países desenvolvidos. O câncer é invariavelmente fatal, se não for tratado. O diagnóstico precoce e o tratamento imediato são vitais, e a identificação de pessoas em risco aumentado de câncer antes de seu desenvolvimento é um objetivo importante das pesquisas do câncer.

Neste capítulo, destacaremos que *o câncer é fundamentalmente uma doença genética* (boxe). Descreveremos os tipos de genes implicados em iniciar o câncer e os mecanismos pelos quais a disfunção destes genes pode resultar na doença. Descreveremos várias síndromes de câncer herdado e demonstraremos como o conhecimento de sua patogenia iluminou a base do câncer em geral. Também descreveremos alguns dos desafios especiais que tais síndromes apresentam para a genética médica e a consulta genética.

A Base Genética do Câncer

1. Independente do câncer ocorrer esporadicamente em uma pessoa ou repetidas vezes em muitas pessoas de uma família como uma característica hereditária, o câncer é uma doença genética.
2. Diferentes tipos de genes foram implicados em iniciar o processo do câncer. Eles incluem genes codificantes de:
   * proteínas das vias de sinalização para a proliferação celular;
   * componentes do citoesqueleto envolvidos na manutenção da inibição por contato;
   * reguladores do ciclo mitótico;
   * componentes da maquinaria de morte celular programada;
   * proteínas responsáveis pela detecção e pelo reparo de mutações.
3. Diferentes tipos de mutações são responsáveis por causar o câncer. Isto inclui:
   * mutações ativadoras de ganho de função de um alelo de um **proto-oncogene**;
   * perda de função de ambos os alelos ou mutação negativa dominante de um alelo de um **gene supressor tumoral**;
   * **translocações cromossômicas** que causam má expressão de genes ou criam genes quiméricos que codificam proteínas que ganharam novas propriedades funcionais.
4. Uma vez iniciado, o câncer evolui pelo acúmulo de danos genéticos adicionais por meio de mutações ou silenciamento epigenético dos genes que codificam a maquinaria celular que repara o DNA danificado e mantém a normalidade citogenética.

BIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer não é uma doença única, mas sim um nome usado para descrever as formas mais virulentas de **neoplasia**, um processo de doença caracterizado por uma proliferação celular descontrolada, que leva a uma massa ou tumor (**neoplasma**). Para um neoplasma ser um câncer, entretanto, ele tem que adicionalmente ser **maligno**, o que significa que seu crescimento não é mais controlado e o tumor é capaz de invadir os tecidos vizinhos ou se espalhar (**disseminar-se por metástase**) para sítios mais distantes, ou ambos. (Os tumores que não fazem metástase não são cancerosos, mas são chamados de tumores **benignos**, embora seu tamanho e localização possam torná-los tudo, menos benignos, para o paciente.) Existem três formas principais de câncer: os **sarcomas**, nos quais o tumor surgiu em tecido mesenquimal, tal como osso, músculo ou tecido conjuntivo; os **carcinomas**, que se originam no tecido epitelial, tal como as células que revestem o intestino, os brônquios ou os dutos mamários; e as malignidades **hematopoéticas** e **linfóides**, tais como as leucemias e os linfomas, que se espalham pela medula óssea, pelo sistema linfático e pelo sangue periférico. Dentro de cada um dos grupos principais, os tumores são classificados de acordo com o local, o tipo de tecido, o aspecto histológico e o grau de malignidade.

A neoplasia, um acúmulo anormal de células, ocorre em decorrência de um desequilíbrio entre a proliferação celular e o atrito celular. As células proliferam à medida que passam pelo ciclo celular e sofrem mitose, enquanto o atrito, devido à morte celular programada, remove as células de um tecido por meio de um processo normal de fragmentação do DNA e suicídio celular chamado de **apoptose** (Fig. 16.1).

BASE GENÉTICA DO CÂNCER

Os processos de divisão e morte celular são regulados por uma grande gama de genes. Amplas pesquisas realizadas durante as últimas

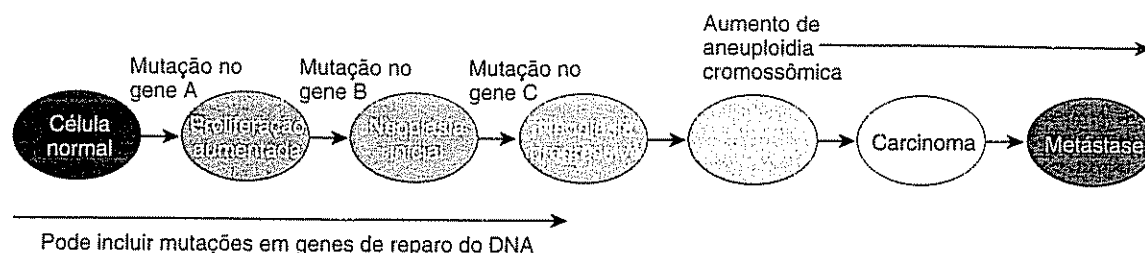



Fig. 16.1 Estágios da evolução do câncer Os graus crescentes de anomalia estão associados à perda seqüencial de genes supressores tumorais de vários cromossomos e à ativação de proto-oncogenes, com ou sem um defeito concomitante no reparo do DNA Por exemplo, o câncer esporádico com defeitos de reparo no DNA é menos comum que os cânceres sem reparo anormal, mas, quando presente, pode se desenvolver juntamente com uma via diferente, mas paralela, levando ao ponto final comum da malignidade

décadas revelaram que as *mutações nos genes que controlam a proliferação e a morte são responsáveis pelo câncer.* Na maioria dos cânceres, as mutações ocorrem em uma única célula somática, que então se divide e continua se desenvolvendo no câncer. Mais raramente, quando o câncer ocorre como parte de uma síndrome de câncer hereditário, as mutações iniciais causadoras de câncer são herdadas por meio da linhagem germinativa e, portanto, já estão presentes em cada célula do corpo. Por ambos os mecanismos, uma vez iniciado, o câncer evolui pelo acúmulo adicional de danos genéticos por meio de mutações nos genes que codificam a maquinaria celular que repara o DNA danificado e mantém a normalidade citogenética. Os danos a estes genes produzem uma cascata pior de mutações em um número crescente de genes que controlam a proliferação celular e o reparo aos danos no DNA. Deste modo, o clone original de células neoplásicas pode evoluir em várias sublinhagens de graus variados de malignidade, cada uma carregando um conjunto de mutações que são diferentes das mutações de outras sublinhagens, mas a elas se superpõem. A Fig. 16.1 ilustra um paradigma geral que, embora mais bem elucidado no caso do câncer de cólon (ver mais adiante neste capítulo), provavelmente se aplica a muitos dos cânceres, se não a maioria. É um modelo conceitual útil que fornece uma estrutura para considerar o papel das mudanças genéticas no câncer, como destacaremos ao longo deste capítulo.

É útil separar os genes envolvidos no câncer em duas categorias distintas: os **oncogenes** e os **genes supressores tumorais** (Fig. 16.2). Os oncogenes são mais comumente alelos mutantes ("ativados") de uma classe de genes celulares normais conhecidos como **proto-oncogenes**, mas também podem ser genes tais como os que codificam telomerase ou genes bloqueadores de apoptose (ver adiante). Os oncogenes em geral se devem a mutações de *ganho de função* (ver Cap. 11) que facilitam a transformação maligna por mecanismos tais como o estímulo da proliferação, o aumento de suprimento de sangue para o tumor e a inibição da apoptose. Os genes supressores tumorais, como o nome indica, bloqueiam o desenvolvimento de um tumor regulando o crescimento celular. A *perda de função* das proteínas codificadas pelos genes supressores tumorais leva a uma divisão celular descontrolada e ao crescimento celular anormal ou apoptose deficiente.

As mutações ocorrem continuamente durante a divisão celular (ver Cap. 6), e os oncogenes e os genes supressores tumorais em geral não são inerentemente mais mutáveis que os outros genes. O que torna as mutações no câncer diferentes de outras mutações é a forte seleção positiva para a proliferação celular ou sobrevida causada pelas mutações. É exatamente o fenótipo de uma célula cancerosa, sua proliferação descontrolada e excessiva, que permite que uma célula mutante se desenvolva em uma doença que ameaça a vida. Em contraste, as mutações que fazem com que uma célula dentre muitas perca a função ou morra não têm efeitos fenotípicos porque a perda da célula é mascarada pela grande maioria de células saudáveis em um órgão ou tecido.

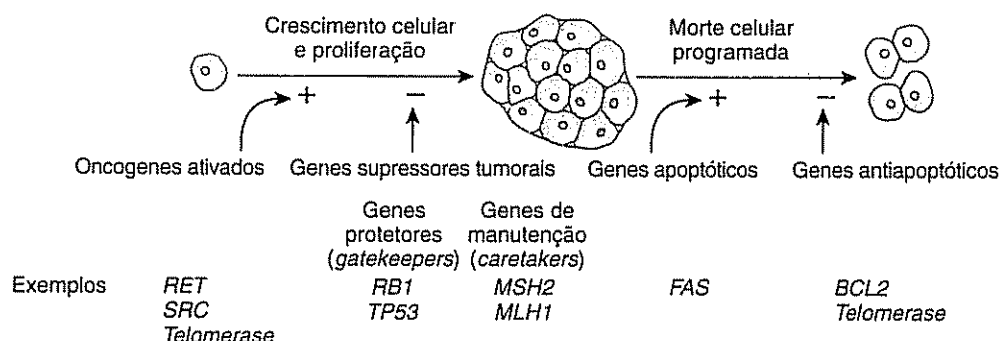



Fig. 16.2 Esquema geral para mecanismos de oncogênese pela ativação de proto-oncogene, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes antiapoptóticos ou perda de genes pró-apoptóticos O efeito dos genes que acentuam um processo é mostrado como +, enquanto o efeito dos genes que suprimem um processo é mostrado como – A divisão celular e a proliferação são estimuladas (+) pelos produtos dos proto-oncogenes Alguns genes supressores tumorais regulam diretamente a função dos proto-oncogenes (genes protetores — *gatekeepers*) Outros atuam mais indiretamente, mantendo a integridade e corrigindo as mutações durante a replicação do DNA e a divisão celular (genes de manutenção — *caretakers*) A ativação de um gene antiapoptótico permite um acúmulo excessivo de células, enquanto a perda da função de genes apoptóticos tem o mesmo efeito A ativação dos oncogenes ou genes antiapoptóticos é dominante e requer apenas um único alelo mutante A ação dos genes supressores tumorais é recessiva Quando ambos os alelos são mutados ou perdidos, o crescimento celular é desregulado ou a integridade genômica é comprometida A perda de genes pró-apoptóticos pode ocorrer pela perda de ambos os alelos ou por uma mutação dominante negativa em um alelo

Câncer nas Famílias

Muitas formas de câncer têm uma incidência mais alta em parentes de pacientes que na população em geral. Mais proeminente entre estas formas familiares de câncer são os quase 50 distúrbios mendelianos nos quais o risco de câncer é muito alto (Quadro 16.1), o que indica que algumas mutações de câncer em um único gene podem ser fatores que contribuem de modo predominante para a causa da doença. Extensos estudos epidemiológicos mostraram, entretanto, que algumas famílias têm um risco acima da média de câncer, mesmo na ausência de um padrão mendeliano óbvio. Por exemplo, uma incidência aumentada de câncer, na faixa de duas a três vezes, foi observada em parentes de primeiro grau de probandos, o que sugere que muitos cânceres são características complexas que resultam tanto de fatores genéticos quanto ambientais (ver Cap. 15). Assim, uma história familiar de câncer em um parente de primeiro ou segundo grau de um paciente deve fazer com que o médico suspeite de aumento do risco de câncer no paciente.

Embora as pessoas com uma forte predisposição hereditária ao câncer provavelmente representem menos de 5% de todos os pacientes com câncer, a identificação de uma base genética para sua doença tem grande importância tanto para o tratamento clínico destas famílias quanto para a compreensão do câncer em geral. Primeiro, os parentes das pessoas com fortes predisposições, que com mais freqüência se devem a mutações em um único gene, podem receber a oferta de testes e consulta genética, para a tranqüilidade apropriada ou o monitoramento mais intenso e a terapia, dependendo dos resultados dos testes. Segundo, como é o caso em muitas doenças comuns, a compreensão das formas hereditárias da doença nos dá informações cruciais sobre os mecanismos da doença que vão além das próprias formas hereditárias. Se é preciso uma série de mutações para que uma malignidade se desenvolva (ver a Fig. 16.1), se esperaria que uma mutação herdada em qualquer um dos genes críticos tivesse um forte impacto na predisposição dos portadores ao câncer, podendo contribuir para uma parte substancial de todos os cânceres. Os portadores de tais genes poderiam contribuir para uma vasta maioria de cânceres que não são reconhecidos como "familiares".

ONCOGENES

Um **oncogene** é um gene mutante cujo funcionamento ou expressão alterada resulta em uma estimulação anormal da divisão celular e proliferação. As mutações ativadoras podem ser no próprio oncogene, em seus elementos reguladores ou mesmo em seu número de cópias genômicas, levando a um funcionamento desregulado ou hiperexpressão do produto oncogênico. Os oncogenes têm um efeito dominante no nível celular. Isto é, quando ativado ou hiperexpresso, um único alelo mutante é suficiente para mudar o fenótipo de uma célula de normal para maligno.

Síndromes Hereditárias Devidas a Oncogenes Ativados

Adenomatose Endócrina Múltipla, Tipo 2

A adenomatose endócrina múltipla, tipo 2 (MEN2), em seu tipo mais comum de variante A, é um distúrbio autossômico dominante caracterizado por uma alta incidência de carcinoma medular da tireóide (um tumor produtor de tirocalcitonina de células parafoliculares da tireóide) que em geral, mas nem sempre, está associado ao feocromocitoma ou aos adenomas paratireóideos benignos, ou ambos. A variante mais rara tipo B, chamada de MEN2B, apresenta, além dos tumores vistos nos pacientes com MEN2A, um espessamento dos nervos e o desenvolvimento de tumores neurais benignos, conhecidos como **neuromas**, na superfície da mucosa da boca e dos lábios. As mutações responsáveis por MEN2 são no gene *RET*, que codifica um receptor de tirosina cinase que serve como receptor para dois ligandos, o fator de crescimento derivado da linhagem celular glial (gdnf) e neurturina, e é o mesmo gene implicado na doença de Hirschsprung (ver Cap. 15). Os receptores de tirosina cinase transduzem um sinal externo, tal como a associação do ligando do receptor, sofrendo uma mudança conformacional, tal como uma dimerização. A mudança conformacional no receptor ativa uma atividade intrínseca de cinase que fosforila outras proteínas celulares, iniciando assim uma cascata de mudanças nas interações proteína-proteína e DNA-proteína, bem como na atividade enzimática de muitas proteínas. Em oposição às mutações de *perda de função* em *RET* encontradas na doença de Hirschsprung, as mutações *RET* em MEN2A e MEN2B são mutações de ponto específicas, que *ativam* o receptor e fazem com que ele fosforile tirosinas mesmo na ausência de ligação de gdnf ou neurturina. As pessoas que herdam uma mutação ativadora em *RET* têm uma chance de aproximadamente 60% de desenvolver carcinoma medular sintomático da tireóide, embora testes mais sensíveis, tais como os testes sangüíneos para tirocalcitonina ou catecolaminas urinárias sintetizadas por feocromocitomas, sejam anormais em mais de 90% dos heterozigotos para MEN2.

Carcinoma Renal Papilar Hereditário

Compreendendo cerca de 15% de todos os neoplasmas de célula renal, os carcinomas renais papilares contêm hastes vascularizadas de tecido conjuntivo circundando as células neoplásicas. Em algumas famílias, o carcinoma renal papilar é herdado como uma característica autossômica dominante decorrente de uma mutação no gene para *MET*, outro receptor de tirosina cinase. Como em *RET* na MEN2, as mutações em *MET* no carcinoma renal papilar hereditário (HPRC) são mutações ativadoras que fazem com que o receptor funcione como uma tirosina cinase ativa, mesmo na ausência de seu ligando normal, o fator de crescimento do hepatócito.

Clonalidade e Especificidade Tissular da Adenomatose Endócrina Múltipla Tipo 2 e do Carcinoma Renal Papilar Hereditário

Embora saibamos a partir da natureza hereditária do carcinoma medular da tireóide e do HPRC que as mutações em *RET* ou *MET* são a causa subjacente dos cânceres, nem todas as células parafoliculares da tireóide ou células papilares renais tornam-se de fato cancerosas, o que indica que os próprios oncogenes não são suficientes para causar a doença. Outras mutações genômicas e cromossômicas ocorrem, tais como a perda de uma parte do cromossomo 1p nos carcinomas medulares tireoideanos na MEN2A e a trissomia do 7 devida à duplicação do cromossomo 7 portador de oncogene *MET* ativado em tecido de carcinoma renal no HPRC. Estes eventos secundários surgem em múltiplos sítios nas células individuais, cada um dos quais então se divide e se desenvolve em um tumor que se origina de uma única célula e é, portanto, dito como sendo **clonal**.

Tanto *RET* quanto *MET* são expressos em muitos tecidos do corpo e são necessários, no caso de *RET*, para um desenvolvimento embrionário normal dos gânglios autônomos e dos rins e, no caso de *MET*, para o desenvolvimento normal do fígado, dos músculos e da placenta. Ainda é totalmente desconhecido por que

QUADRO 16–1

Síndromes de Câncer Familiar com Herança Mendeliana

Síndrome	*Tumor Primário*	*Cânceres Associados e Outras Características*	*Gene*	*Localização Cromossômica*	*Função Proposta do Produto Gênico*
Herança Autossômica Dominante — Oncogene Ativado					
Neoplasia endócrina múltipla 2	Câncer medular da tireóide	Feocromocitoma tipo 2A, hiperplasia da paratireóide tipo 2B, feocromocitoma, hamartomas de mucosa	*RET*	10q11.2	Receptor transmembranar de tirosina cinase para fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial
Carcinoma renal papilar hereditário	Câncer de célula renal		*MET*	7q31	Receptor transmembranar de fator de crescimento de hepatócito
Herança Autossômica Dominante — Perda de Gene Supressor Tumoral					
Retinoblastoma familiar	Retinoblastoma	Osteossarcoma	*RB1*	13q14.3	Ciclo celular e regulador transcricional
WAGR	Tumor de Wilms	Síndrome de genes contíguos incluindo genitália ambígua e retardo mental	*WT1*	11p13	Repressor de transcrição
Von Hippel-Lindau	Câncer renal (célula clara)	Feocromocitomas, angiomas retinais, hemangioblastomas	*VHL*	3p25	Regulador de transcrição de RNA
Carcinoma nevóide de célula basal	Câncer de célula basal da pele	Cistos mandibulares, depressões palmares e plantares, meduloblastoma, fibromas ovarianos	*PTCH*	9q22.3	Receptor transmembranar de sinalização pela molécula *hedgehog*
Doença de Cowden	Câncer de mama, câncer de tireóide (folicular)	Pólipos intestinais	*PTEN*	10q23.3	Fosfatase de proteínas e lipídios
Peutz-Jeghers	Câncer gastrintestinal	Câncer testicular, ovariano	*STK11*	19p13.3	Cinase proteica de serina/treonina
Melanoma familiar	Melanoma	Câncer pancreático, nevi displásicos, molas atípicas	*CDKN2*	9p21	Inibidor de CDK4 e CDK6, cinases que promovem a transição de G_1 para a fase S do ciclo celular
			CDK4	12q14	Cinase proteica que sinaliza divisão celular
Neurofibromatose, tipo 1	Neurofibromas	Neurofibrossarcomas, tumores cerebrais	*NF1*	17q11.2	Regulação de proteínas G tipo *RAS*
Neurofibromatose, tipo 2	Neuromas acústicos, meningiomas	Gliomas, ependimomas, mesotelioma	*NF2*	22q12.2	Ligação entre proteínas da membrana e citoesqueleto celular
Polipose adenomatosa familiar	Câncer colorretal	Tumores duodenais e gástricos, anomalias de retina, osteomas de mandíbula e tumores desmóideos, meduloblastoma, glioblastoma (síndrome de Turcot)	*APC*	5q21-q22	Regulação de β-catenina, um componente do citoesqueleto celular
Câncer gástrico familiar	Câncer gástrico		*CDH1*	16q22	E-caderina, envolvida na adesão celular

continua

QUADRO 16-1 (*Continuação*)

Síndromes de Câncer Familiar com Herança Mendeliana

Síndrome	Tumor Primário	Cânceres Associados e Outras Características	Gene	Localização Cromossômica	Função Proposta do Produto Gênico
Herança Autossômica Dominante — Perda de Gene Supressor Tumoral (*continuação*)					
Neoplasia endócrina múltipla, tipo 1	Ilhota pancreática	Hiperplasia da paratireóide, adenomas hipofisários	*MEN1*	11q13	Desconhecida
Herança Autossômica Dominante — Perda de Genes de Reparo do DNA					
Li-Fraumeni	Sarcomas, câncer de mama	Tumores cerebrais, leucemias	*TP53*	17p13.1	Fator p53 de transcrição que responde a danos no DNA para induzir apoptose
Câncer de mama familiar, tipo 1	Câncer de mama	Câncer ovariano	*BRCA1*	17q21	Reparo de quebras bifilamentares no DNA?
Câncer de mama familiar, tipo 2	Câncer de mama	Câncer pancreático, câncer de mama em homens	*BRCA2*	13q12	Reparo de quebras bifilamentares do DNA?
Câncer hereditário colorretal não-polipose	Câncer colorretal	Câncer endometrial, ovariano, hepatobiliar e de bexiga, glioblastoma (síndrome de Turcot)	*MSH2* *MLH1* *PMSL1* *PMSL2* *MSH6*	2p22-p21 3p21 2q31.1 7p22 2p16	Reparo de mau pareamento de bases do DNA. Mantém a estabilidade de repetições simples em tandem do DNA
Herança Autossômica Dominante — Interferência na Apoptose					
Síndrome linfoproliferativa auto-imune	Linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin	Intensa linfadenopatia e esplenomegalia, anemia hemolítica e trombocitopenia	*TNFRSF6* (*FAS*) *TNFSF6* (*FASL*)	10q24.1 1q23	Receptor que transduz sinal apoptótico de ligando fas Ligando fas
Herança Autossômica Recessiva — Integridade Anormal do Genoma					
Ataxia telangiectasia	Linfoma	Degeneração cerebelar, esterilidade	*ATM*	11q22-q23	Reparo do DNA
Bloom	Tumores sólidos	Imunodeficiência, baixa estatura, anomalias pigmentares, sensibilidade ao sol, infertilidade, instabilidade cromossômica	*BLM*	15q26.1	DNA helicase?
Xeroderma pigmentoso (total de sete grupos complementares, designados de A a G. Todos os 7 genes foram clonados)	Câncer de pele	Sensibilidade ao sol, hipogonadismo, retardo mental ocasional e neurodegeneração	*XPB* *XPD* *XPA* *XPC* *XPF* *XPE* *XPG*	2q21 19q13 9q22.3 3p25 16q13 11p11-p12 13q33	Componentes da maquinaria de reparo de DNA envolvida na excisão e no reparo de danos de luz ultravioleta
Anemia de Fanconi (total de 8 grupos de complementação, A-H)	Leucemia	Pancitopenia, hipoplasia do osso radial/polegar, instabilidade cromossômica, ocasionais anomalias cardíacas e renais	*FANCA* *FANCC* *FANCD* *FANCE*	16q24.3 9q22.3 3p25.3 11p15	Componentes da maquinaria de reparo do DNA

as mutações ativadoras na linhagem germinativa nestes dois proto-oncogenes resultam em cânceres particulares de tipo histológico distinto restrito a tecidos específicos, pois outros tecidos nos quais o oncogene é expresso não desenvolvem tumores. Talvez nestes tecidos nos quais o oncogene é expresso a ativação de *RET* ou *MET* não confira uma vantagem de crescimento.

Ativação de Oncogenes no Câncer Esporádico

Muito antes da descoberta das síndromes de câncer hereditário decorrentes de herança autossômica dominante de proto-oncogenes ativados, muitos oncogenes mutados, incluindo *RET*

e *MET*, tinham sido identificados em cânceres esporádicos. Estes oncogenes foram descobertos usando-se um poderoso teste conhecido como **transformação mediada por DNA** (Fig. 16.3). O DNA humano, extraído e purificado de linhagens celulares de câncer esporádico, foi introduzido em uma linhagem celular de camundongo não-tumorigênica em cultura, para gerar colônias de células que foram **transformadas**, isto é, que tinham adquirido propriedades tumorigênicas. O DNA contendo uma parte do DNA tumorigênico, incluindo o oncogene responsável, foi isolado de uma colônia de células de camundongo transformadas, transferido novamente para as células de camundongo não-tumorigênicas e as colônias transformadas foram identificadas. Este processo foi repetido até que, eventualmente, o único DNA humano presente nas células transformadas era o pequeno segmento contendo o oncogene humano ativado derivado inicialmente da linhagem celular de câncer humano. Usando a repetição *Alu* específica de humanos (ver Cap. 3) como sonda de hibridização, os cientistas puderam identificar e clonar o DNA genômico humano codificante do oncogene transformante de uma biblioteca feita a partir da célula transformada de camundongo (ver Cap. 4).

Fig. 16.3 Triagem de transformação mediada por DNA. O DNA de alto peso molecular de uma linhagem celular tumoral é aplicado a uma camada de células de camundongo não-transformadas e as células são induzidas a captar o DNA. Aparecem algumas colônias de células transformadas. Uma única colônia é isolada, seu DNA é isolado, e o processo de aplicação do DNA às células de camundongo não-transformadas é repetido. Após alguns ciclos, o único DNA humano dentro de uma célula transformada será o DNA contendo um oncogene ativado presente na linhagem celular tumoral original. As seqüências de repetição específicas de humanos (tais como *Alu*) podem ser usadas para identificar e clonar as seqüências de DNA humano contendo o oncogene ativado de uma biblioteca genômica feita de DNA das células transformadas de camundongo.

Um dos primeiros oncogenes ativados descobertos pelo teste de transformação foi um gene *RAS* mutante derivado de uma linhagem celular de carcinoma de bexiga. *RAS* codifica uma de uma grande família de proteínas de ligação de guanosina trifosfato (GTP) (as **proteínas G**). As proteínas G servem como interruptores moleculares "liga-desliga" que ativam ou inibem as moléculas seguintes quando ligadas a GTP, mas terminam seu efeito quando o GTP ligado é clivado em guanosina difosfato (GDP) por uma ativade enzimática GTPase intrínseca. O oncogene ativado e sua contraparte normal proto-oncogene diferem em apenas um único par de bases. A alteração, uma mutação de ponto em uma célula somática do tumor, leva à síntese de uma proteína ras anormal que é capaz de sinalizar continuamente, mesmo na ausência de GTP ligado, para estimular o crescimento da linhagem celular, transformando-a, assim, em um tumor. As mutações de ponto *RAS* são observadas em muitos tumores, e os genes *RAS* foram desmonstrados experimentalmente como sendo o alvo mutacional de carcinógenos conhecidos, um achado que apóia um papel dos genes mutados *RAS* no desenvolvimento de muitos cânceres.

Hoje em dia, mais de 50 oncogenes humanos (e, portanto, seus proto-oncogenes normais) já foram identificados com base nos estudos de transformação de DNA com DNA genômico de tumores humanos. Os exemplos de alguns destes oncogenes são dados no Quadro 16.1. Os vários papéis das muitas classes de proto-oncogenes na regulação do crescimento são ilustrados na Fig. 16.4.

Ativação de Oncogenes por Translocação Cromossômica

A mutação gênica é apenas um dos vários mecanismos que podem induzir a ativação de proto-oncogenes (Quadro 16.2). Em alguns casos, um proto-oncogene é ativado por uma mutação cromossômica, em geral por translocação (Quadro 16.3). Mais de 40 translocações cromossômicas oncogênicas foram descritas, principalmente em leucemias esporádicas e linfomas, mas também em alguns raros sarcomas de tecido conjuntivo. Em alguns casos, os pontos de quebra das translocações são dentro dos íntrons de dois genes, produzindo, assim, uma proteína quimérica com propriedades novas (ganho de função), que são oncogênicas. O exemplo mais bem conhecido é a translocação entre os cromossomos 9 e 22 que é vista na leucemia mielóide crônica (CML). Em outros, a translocação ativa um oncogene colocando-o em seguida a um forte promotor constitutivo que pertence a outro gene. Dois exemplos bem conhecidos são a translocação entre os cromossomos 8 e 14, no linfoma de Burkitt, e a translocação envolvendo o cromossomo 18, no linfoma de células B.

Leucemia Mielóide Crônica. Na CML, a anomalia citogenética vista, o chamado cromossomo Philadelphia (Ph^1), é o produto de uma translocação entre os cromossomos 9 e 22 (Fig. 16.5). A translocação move o proto-oncogene *ABL*, uma tirosina cinase, de sua posição normal no cromossomo 9q para a

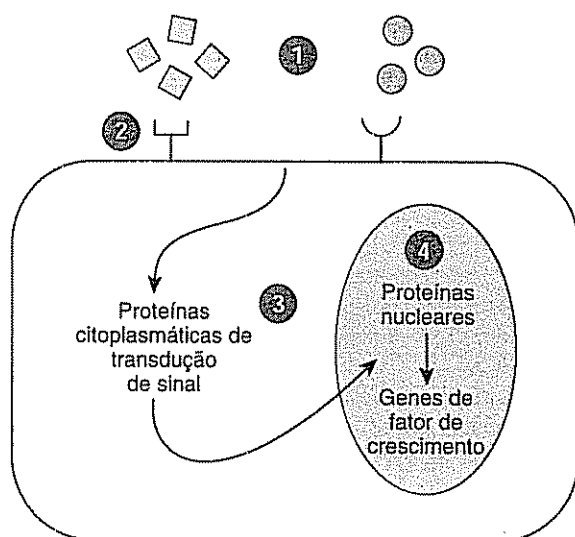



Fig. 16.4 Transdução de sinais e regulação do crescimento pelos produtos dos proto-oncogenes, classificados por sua localização e funcionamento na célula. A desregulação de um proto-oncogene pode levar a uma transformação maligna. 1. Fatores de crescimento secretados, tais como o fator de crescimento embrionário (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). 2. Receptores específicos para fatores de crescimento secretados, tais como *RET*. 3. Proteínas citoplasmáticas de transdução de sinal, tais como a proteína G codificada por RAS e a cinase proteica codificada por *ABL*. 4. Proteínas nucleares, tais como o fator de transcrição codificado por *MYC* que se liga ao DNA e modifica a transcrição

"região do ponto de quebra" do gene (*BCR*), um gene de função desconhecida no cromossomo 22q. A justaposição das seqüências *BCR* e das seqüências *ABL* permite a síntese de uma proteína quimérica que é maior que a proteína abl normal e tem um aumento de atividade de tirosina cinase. Embora a função das proteínas abl e bcr normais ainda não esteja clara, o aumento de atividade de tirosina cinase da nova proteína codificada pelo gene quimérico é o evento primário causador da leucemia crônica.

Linfoma de Burkitt. O linfoma de Burkitt é um tumor de células B da mandíbula que tem uma distribuição geográfica incomum: é o tumor mais comum em crianças da África equatorial, mas é raro em outras partes. Na maioria dos tumores deste tipo, o proto-oncogene *MYC* é translocado de sua posição cromossômica normal em 8q24 para uma posição distal ao locus de cadeia pesada de imunoglobulina em 14q32. Citogeneticamente, isto é visto como uma aparente translocação balanceada 8;14. A translocação supostamente coloca o acentuador ou outras seqüências ativadoras de transcrição, normalmente associadas aos genes de imunoglobulina, perto do gene *MYC*. Apoiando esta hipótese está o achado de que outras translocações observadas em uma menor proporção dos casos de linfoma de Burkitt envolvem a translocação dos genes de cadeia leve de imunoglobulina nos cromossomos 22 ou 2 perto do gene *MYC* (ver Quadro 16.3). Em ambos os casos, estas translocações têm claramente um efeito importante no gene *MYC*, permitindo sua expressão desregulada e resultando em um crescimento celular descontrolado. A função da proteína myc ainda não é totalmente conhecida, mas parece ser um fator de transcrição com poderosos efeitos na expressão de vários genes envolvidos na proliferação celular, bem como na expressão da telomerase (ver discussão mais adiante).

Linfoma de Célula B Folicular. A apoptose, ou morte celular programada, é um processo normal, no qual as células são induzidas a sofrer uma forma estereotipada de suicídio caracterizada por fragmentação de DNA celular e ativação de uma família de proteases de cisteína, conhecidas como caspases, dentro das células. A apoptose tem um papel crucial no desenvolvimento normal. É particularmente proeminente no desenvolvimento do sistema imune, no qual a grande maioria dos linfócitos em desenvolvimento deve ser destruída para se proteger contra células que poderiam reagir a antígenos da própria pessoa. A hiperexpressão de uma proteína antiapoptótica nas linhagens de linfócitos pode resultar em uma grande expansão das populações de linfócitos, contribuindo, assim, para a patogenia do linfoma.

O primeiro gene apoptótico implicado no câncer foi identificado no linfoma esporádico de células B. Em quase todos os linfomas de células B do tipo folicular, um gene, o *BCL2*, situado em 18q21, foi encontrado ativado por uma translocação cromossômica t(14;18), que coloca o gene sob um forte promotor e acentuador do gene de cadeia pesada de imunoglobulina situado em 14q32. A proteína codificada por *BCL2* é uma proteína da membrana interna mitocondrial com poderosos efeitos antiapoptóticos nas células B. A expressão prolongada e imprópria deste gene ativada pelo promotor de imunoglobulina resulta em uma intensa expansão de células B, não em função de um aumento de proliferação, mas sim pelo fato da apoptose normal destas células estar inibida.

TELOMERASES COMO ONCOGENES

Um outro tipo de oncogene que foi recentemente descoberto é o gene codificante da **telomerase**, uma transcriptase reversa responsável por aumentar os telômeros nas pontas dos cromossomos. O DNA é uma estrutura bifilamentar, com os dois filamentos correndo em sentidos inversos em relação à estrutura

QUADRO 16-2

Mecanismos de Ativação de Proto-oncogenes

Mecanismo	Tipo de Gene Ativado	Resultado
Mutação reguladora	Genes de fator de crescimento	Aumento de expressão ou secreção
Mutação estrutural	Receptores de fator de crescimento, proteínas de transdução de sinal	Permite autonomia de expressão
Translocação, inserção retroviral, amplificação gênica	Oncogenes nucleares	Hiperexpressão

De Miller D. M., Blume S., Borst M., *et al* (1990) Oncogenes, malignant transformation, and modern medicine. Am J Med Sci 300:59-69.

QUADRO 16-3

Translocações Cromossômicas Características em Malignidades Humanas Selecionadas

Neoplasia	Translocação Cromossômica	% de casos	Proto-oncogene Afetado
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	80%	*MYC*
	t(8;22)(q24;q11)	15%	
	t(2;8)(q11;q24)	5%	
Leucemia mielóide crônica	t(9;22)(q34;q11)	90%-95%	*BCR – ABL*
Leucemia linfocítica aguda	t(9;22)(q34;q11)	10%-15%	*BCR – ABL*
Leucemia linfoblástica aguda	t(1;19)(q23;p13)		gene homeobox *PRL*
Leucemia promielocítica aguda	t(15;17)(q22;q11)		receptor de ácido retinóico
Leucemia linfocítica crônica	t(11;14)(q13;q32)	10%-30%	*BCL-1*
Linfoma folicular	t(14;18)(q32;q21)		*BCL-2*

Baseado em Croce C. M. (1987) Role of chromosome translocations in human neoplasia. Cell 49:155-156; Park M., van de Woude G. F. (1989) Oncogenes: Genes associated with neoplastic disease. *In* Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D. (eds) The Molecular and Metabolic Bases of Inherited Disease, 6.ª ed McGraw-Hill, New York, pp. 251-276; Nourse J., Mellentin J. D., Galili N. *et al* (1990) Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. Cell 60:535-545; Borrow J., Goddard A.D., Sheer D., Solomon E. (1990) Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. Science 249:1577-1580

fosfodiéster (ver Cap. 3). Assim, um dos filamentos (chamado de "filamento *lagging*") na forquilha de replicação deve replicar-se descontinuamente, porque a DNA polimerase só pode adicionar à ponta 3′ de um filamento de DNA em crescimento. A célula faz a síntese do filamento descontínuo sintetizando fragmentos de DNA a partir da ponta 3′ dos *primers* de RNA que são complementares ao DNA situado em 5′ da forquilha. A replicação do filamento quando sua ponta 5′ está no telômero, entretanto, é um problema, porque não há DNA para servir como molde para os *primers* de RNA além da ponta do cromossomo. Nestas condições, a cada rodada de replicação, o filamento *lagging* não pode se replicar até a ponta do cromossomo, e o telômero fica cada vez mais curto. A manutenção dos telômeros durante a divisão celular é o trabalho de uma ribonucleoproteína especial, a enzima telomerase, que usa seu próprio RNA como molde para a adição de um DNA repetitivo nos telômeros. Espécies diferentes têm repetições diferentes em seus telômeros. Nos humanos, a telomerase adiciona uma repetição de DNA hexamérica, TTAGGG (Fig. 16.6).

Fig. 16.5 A translocação no cromossomo Philadelphia, t(9;22)(q34;q11). O cromossomo Philadelphia (Ph¹) é o cromossomo derivativo 22, que trocou parte de seu braço longo por um segmento do cromossomo 9q que contém o oncogene *ABL*. A formação de um gene quimérico *BCR-ABL* no cromossomo Ph¹ é o evento genético crítico no desenvolvimento da leucemia mielóide crônica

Nas células germinativas humanas, os telômeros contêm cerca de 15 kb de repetição hexamérica telomérica. Durante o desenvolvimento, à medida que as células se diferenciam, o funcionamento da telomerase declina e os telômeros se encurtam, levando finalmente a uma perda de aproximadamente 35 pares de bases de DNA de repetição telomérica a cada divisão celular. Após centenas de divisões celulares, as pontas dos cromossomos ficarão danificadas, e os genes situados perto dos telômeros podem ser deletados. O dano ao DNA, por sua vez, faz com que as células parem de se dividir e entrem em G_0 do ciclo celular por meio da via de p53 e Rb1 (ver a próxima seção). Foi sugerido que a **senescência celular**, a incapacidade das células normais dividirem-se indefinidamente em cultura, pode ser uma manifestação da perda de função da telomerase.

Em contraste, a expressão da telomerase reaparece nas células transformadas em cultura e em muitos tumores, acentuando, assim, a capacidade das células tumorais de se proliferarem indefinidamente. Em alguns casos, o surgimento da atividade de telomerase resulta de mutações cromossômicas ou genômicas que aumentam diretamente o funcionamento do gene de telomerase. Em outros, a telomerase pode ser apenas um dos muitos genes cuja expressão é alterada por um oncogene transformante de fator de transcrição, tal como *MYC*. Em qualquer um dos casos, o reaparecimento da atividade de telomerase está sendo usado como um instrumento diagnóstico para o câncer nas células obtidas por biópsia ou aspiração com agulha de lesões cancerosas suspeitas. Ainda mais importante, o papel das telomerases em acentuar a proliferação celular sugere que a inibição da telomerase pode ser um novo alvo potencial significativo para o tratamento do câncer.

GENES SUPRESSORES TUMORAIS

Enquanto as proteínas controladas por oncogenes promovem o câncer, em geral por mutações de ganho de função ou pelo aumento ou expressão imprópria de um alelo do gene, existem muitos outros genes nos quais as mutações contribuem para a malignidade por um mecanismo diferente: a perda de função de

Fig. 16.6 Diagrama da replicação do telômero e o papel da telomerase A, A seqüência de repetição hexamérica encontrada nas pontas teloméricas de cromossomos humanos B e C. Uma forquilha de replicação que tenta replicar o telômero O fragmento de Okazaki (*seta vermelha*) permite a replicação de quase todo o cromossomo. menos da parte terminal do filamento *lagging* D e E. Telomerase. levando seu próprio molde de RNA (5'-CUAACCCUAAC-3'). amplia o filamento *lagging* na ponta do cromossomo e permite a replicação

ambos os alelos do gene. Tais genes são chamados de **genes supressores tumorais** (ver Fig. 16.2). Os genes supressores tumorais são altamente heterogêneos. Alguns são verdadeiros supressores tumorais, no sentido de que estão diretamente envolvidos na regulação do ciclo celular ou na inibição do crescimento pelo contato célula-célula. Os supressores tumorais deste tipo foram chamados de **genes protetores** (***gatekeepers***), pois regulam *diretamente* o crescimento celular. Outros genes, chamados de **genes de manutenção** (***caretakers***), estão envolvidos em reparar danos ao DNA e manter a integridade genômica. A perda de ambos os alelos dos genes que estão envolvidos em reparar danos ao DNA ou quebras cromossômicas levam *indiretamente* ao câncer, pois permitem que mutações secundárias adicionais se acumulem em proto-oncogenes ou em outros genes supressores tumorais. Os produtos de muitos genes supressores tumorais foram isolados e caracterizados (Quadro 16.4). Como os genes

supressores tumorais e seus produtos são por natureza protetores contra o câncer, espera-se que a compreensão deles eventualmente leve a métodos melhores de terapia anticâncer

Os Dois Eventos de Origem do Câncer

A existência de mutações gênicas supressoras tumorais que levavam ao câncer foi originalmente proposta na década 1960, quando se sugeriu que algumas formas de câncer hereditário podiam ser iniciadas quando uma célula em uma pessoa heterozigota para uma mutação na linhagem germinativa sofria uma segunda mutação somática, tornando, assim, a célula homozigota para mutações de perda de função em um gene supressor tumoral e originando um tumor. A perda de ambos os alelos de um gene supressor tumoral também tem um papel importante na patogenia de muitos cânceres comuns esporádicos, embora, neste caso, ambos os alelos sejam inativados por dois eventos somáticos que ocorrem na mesma célula. Esta **hipótese dos "dois eventos"** foi aplicada pela primeira vez para explicar de que maneira cânceres tais como o retinoblastoma podem ocorrer tanto nas formas hereditária quanto esporádica, mas tem sido amplamente aceita como um modelo importante em muitos cânceres familiares, incluindo a polipose familiar do cólon; o câncer de mama familiar; a neurofibromatose, tipo 1 (NF1); o carcinoma hereditário não-polipose do cólon e a forma rara de câncer familiar conhecida como síndrome de Li-Fraumeni. Embora em cada um destes distúrbios a herança autossômica dominante de um gene mutado em geral seja a regra, a perda de função de ambas as cópias do gene supressor tumoral responsável é necessária para o desenvolvimento do tumor. A explicação deste aparente paradoxo é que as células heterozigotas para uma mutação ainda têm uma cópia funcional de um gene supressor tumoral, que é suficiente para produzir um fenótipo celular normal. Entretanto, uma célula na qual uma cópia já esteja alterada ou perdida pela herança de uma mutação na linhagem germinativa perderá sua capacidade de suprimir o desenvolvimento tumoral se, por acaso, perder o funcionamento do outro alelo restante. Este "segundo evento" em geral é uma mutação somática, embora a perda de função sem mutação, tal como ocorre no silenciamento transcricional, também tenha sido observada em algumas células cancerosas (ver em seguida). O segundo evento pode causar um tumor sempre que ocorrer em uma das numerosas células de um tecido. Por este motivo, os tumores iniciais nas síndromes hereditárias associadas à perda de genes supressores tumorais em geral surgem várias vezes no mesmo tecido. Em contraste, nas formas esporádicas de câncer decorrentes da perda de gene supressor tumoral, provavelmente apenas uma única célula sofre um evento tão raro quanto duas ocorrências na mesma célula. Os cânceres geralmente são monoclonais, e o tumor original surge em um único local no tecido afetado, embora possa formar metástases depois.

O modelo de dois eventos é hoje amplamente aceito como a base tanto dos cânceres hereditários como esporádicos que surgem de mutações que causam perda de função de ambas as cópi-

QUADRO 16–4

Produtos de Genes Supressores Tumorais Selecionados

Gene Supressor Tumoral	Produto Gênico e Possível Função	Distúrbios nos Quais o Gene Está Afetado — Familiar	Distúrbios nos Quais o Gene Está Afetado — Esporádico
RB1	p110 Regulação do ciclo celular	Retinoblastoma	Retinoblastoma, carcinomas de pequena célula do pulmão
TP53	p53 Regulação do ciclo celular	Síndrome de Li-Fraumeni	Câncer de pulmão, câncer de mama
BRCA1, BRCA2	Brca1, Brca2 Participa na resposta às quebras bifilamentares do DNA	Câncer de mama familiar	Câncer de mama, câncer ovariano
NF1	Neurofibromina Proteína ativadora de GTPase	Neurofibromatose, tipo 1	Desconhecido
NF2	Merlin Liga moléculas de superfície celular ao citoesqueleto	Neurofibromatose, tipo 2	Schwannomas esporádicos e meningiomas
DCC	Dcc Receptor de moléculas de orientação axonal (netrinas)	Desconhecidos	Câncer colorretal
VHL	Vhl Parte do complexo de alongamento transcricional	Van Hippel-Lindau	Carcinoma de célula clara renal
MLH1, MSH2	Mlh1, Msh2 Reparo de mau pareamento de nucleotídeos entre filamentos do DNA	Câncer hereditário não-polipose do cólon	Câncer colorretal

as de um gene supressor tumoral dentro de uma célula. Recentemente, a teoria teve de ser ampliada, quando se descobriu que um segundo evento no alelo normal nem sempre é necessariamente uma mutação. O silenciamento devido à metilação excessiva do DNA, associado a uma configuração de cromatina fechada e perda de acesso dos fatores de transcrição ao DNA (ver Caps. 3 e 10), tem sido visto como sendo um importante mecanismo molecular alternativo para a perda de função de um gene supressor tumoral. Como uma alteração no funcionamento de um gene devida à metilação é transmitida estavelmente por mitose, ela se comporta como uma mutação. Como não há mudança no próprio DNA, entretanto, ela é chamada de uma mudança **epigenética** em vez de não-genética. O silenciamento epigenético da expressão gênica é um fenômeno normal que explica fenômenos tão diversos quanto a inativação do X (ver Caps. 5 e 10), o *imprinting* genômico (ver Cap. 5) e a manutenção de um repertório especializado de expressão gênica no desenvolvimento e na manutenção da diferenciação de tecidos específicos (ver Cap. 17).

Genes Supressores Tumorais em Síndromes de Câncer Autossômicas Dominantes

Retinoblastoma

O retinoblastoma, o protótipo das doenças causadas por mutação em um gene supressor tumoral, é um raro tumor maligno da retina em crianças, com uma incidência de cerca de 1 em 20.000 nascimentos (Fig. 16.7). Ao diagnóstico de um retinoblastoma em geral deve se seguir a remoção do olho afetado, embora tumores menores, diagnosticados em estágio inicial, possam ser tratados com terapia local, de modo a preservar a visão.

Fig. 16.7 Retinoblastoma em uma menina, mostrando um reflexo branco no olho afetado quando a luz reflete diretamente da superfície do tumor. (Foto por cortesia de B. L. Gallie, The Hospital for Sick Children, Toronto.)

Cerca de 40% dos casos de retinoblastoma são da forma hereditária, na qual a criança herda um alelo mutante no locus de retinoblastoma (*RB1*) pela linhagem germinativa. Uma mutação somática ou outra alteração em uma única célula da retina leva à perda de função do alelo normal restante, iniciando, assim, o desenvolvimento do tumor (Fig. 16.8). O distúrbio é herdado como uma característica dominante, pois o grande número de retinoblastos primordiais e sua rápida taxa de proliferação torna muito provável que uma mutação somática venha a ocorrer em um ou mais dos mais de 10^6 retinoblastos. Assim, os heterozigotos para o distúrbio em geral são afetados por múltiplos tumores, freqüentemente atingindo ambos os olhos. Entretanto, a penetrância do retinoblastoma, embora alta, não é completa, pois a ocorrência do segundo evento é uma questão de acaso.

Os outros 60% dos casos de retinoblastoma não são hereditários (esporádicos). Nestes casos, *ambos* os alelos *RB1* em uma única célula da retina foram inativados por mutações somáticas independentes. Como este é um evento raro, em geral há apenas um único tumor clonal (o retinoblastoma é unilateral), e a idade média de início é mais tardia que nas crianças com a forma hereditária (ver Fig. 16.8). Para a consulta genética, um outro ponto importante é que 15% dos pacientes com retinoblastoma unilateral têm o tipo hereditário, mas a chance é de que se desenvolva um tumor em apenas um dos olhos.

As crianças com retinoblastoma hereditário têm um risco muito aumentado (400 vezes) de desenvolver tumores mesenquimais, tais como sarcomas osteogênicos, fibrossarcomas e melanomas, no início da vida adulta. O risco é muito mais alto se a criança tiver recebido radioterapia.

O gene *RB1* foi mapeado no cromossomo 13, na banda 13q14. Em uma pequena porcentagem de pacientes com retinoblastoma, a mutação herdada deve-se a uma deleção citogeneticamente detectável ou translocação desta parte do cromossomo 13, um achado que foi instrumental para situar o gene *RB1* neste local. Se tais mudanças cromossômicas também perturbarem os genes adjacentes ao *RB1*, podem levar a características dismórficas, além do retinoblastoma.

O gene *RB1* expressa-se em muitos outros tecidos além da retina, embora a perda de *RB1* inicie tumores apenas na retina e, mais tarde na vida, em um pequeno número de sítios secundários (levando a um sarcoma osteogênico, fibrossarcoma e melanoma). O motivo desta especificidade tissular é desconhecido. O produto do gene *RB1*, descrito como p110 Rb1 (uma proteína com 110 quilodáltons de tamanho), também está ausente ou mutado em várias linhagens celulares derivadas de alguns outros tumores durante sua progressão (ver Quadro 16.4).

A proteína p110 Rb1 é uma fosfoproteína que é hipofosforilada e então hiperfosforilada em diferentes estágios do ciclo celular. Em seu estado hipofosforilado, ela bloqueia a progressão do ciclo celular no limite entre G_1 e S, inibindo assim a entrada na fase S, ligando-se a — e inativando — fatores de transcrição que promovem a síntese de DNA. À medida que p110 Rb1 se torna progressivamente mais fosforilada, ela libera seus parceiros de ligação à proteína, permitindo a entrada da célula na fase S. É então progressivamente desfosforilada durante o curso do ciclo celular, o que permite que ela volte a funcionar como um bloqueio à entrada na fase S do próximo ciclo celular. A perda do gene *RB1* priva as células de um importante ponto de controle mitótico e permite uma proliferação descontrolada. O gene *RB1* é um protótipo de gene supressor tumoral protetor (*gatekeeper*).

Perda de Heterozigose. Os geneticistas que estudam os polimorfismos de DNA na região próxima ao locus *RB1* fizeram uma descoberta genética incomum, mas altamente significativa,

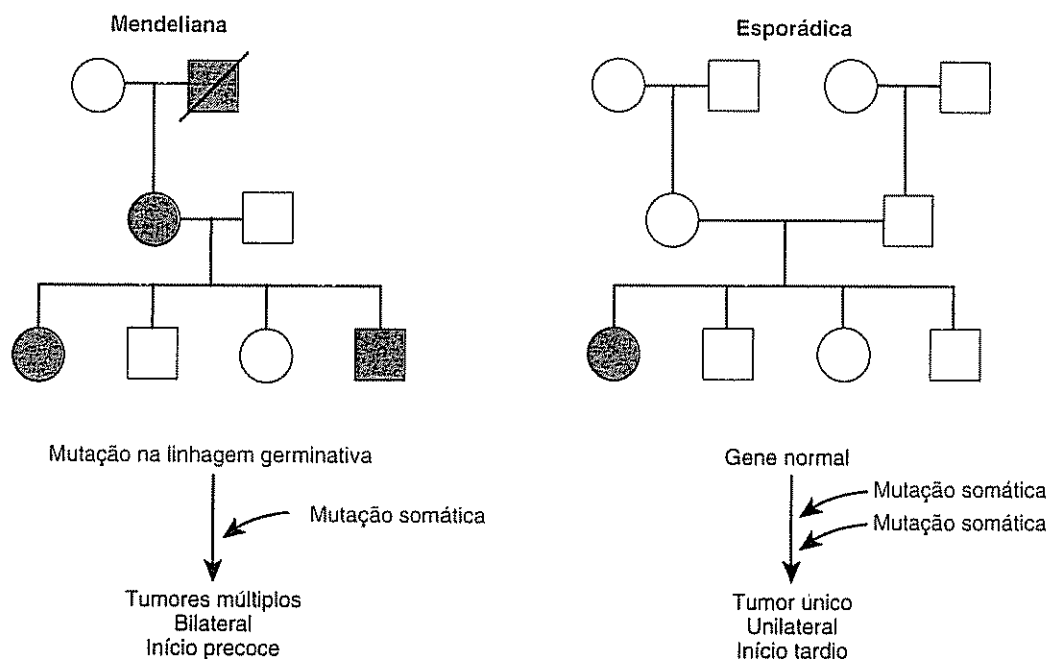



Fig. 16.8 Comparação das formas mendeliana e esporádica de cânceres tais como o retinoblastoma e a polipose familiar do cólon. Os mecanismos de mutação somática são apresentados na Fig. 16.9. Ver o texto para discussão.

quando analisaram os alelos vistos no tecido tumoral de pacientes com retinoblastoma herditário e esporádico. As pessoas com retinoblastoma que eram heterozigotas em tecidos normais, tais como em suas células sanguíneas, tinham tumores que continham alelos de apenas um de seus dois cromossomos 13 homólogos, revelando uma **perda de heterozigose** (LOH) para partes de 13q na região do gene. Nos casos familiares, os marcadores mantidos do cromossomo 13 eram aqueles herdados do genitor afetado, isto é, o com um alelo *RB1* anormal. Assim, LOH representa o segundo evento do alelo restante. LOH pode ocorrer por deleção intersticial, mas existem outros mecanismos, tais como recombinação mitótica ou não-disjunção (Fig. 16.9). LOH é o mecanismo mutacional mais comum pelo qual o alelo restante *RB1* normal é perdido nos heterozigotos. Quando LOH não é vista, o segundo evento em geral é uma segunda mutação gênica somática ou, ocasionalmente, a inativação transcricional de um alelo não-mutado por meio de metilação. LOH é uma característica de vários outros tumores, tanto herdáveis quanto esporádicos, e geralmente é considerada uma evidência da existência de um gene supressor tumoral, mesmo quando este gene é desconhecido (Quadro 16.5).

Síndrome de Li-Fraumeni

Existem "cânceres familiares" raros nos quais há uma história marcante de muitas formas diferentes de câncer (incluindo vários tipos de sarcoma ósseo e de tecidos moles, câncer de mama, tumores cerebrais, leucemia e carcinoma adrenocortical), que afetam vários membros da família em uma idade incomumente jovem, herdados de modo autossômico dominante (Fig. 16.10). Este fenótipo altamente variável é conhecido como a **síndrome de Li-Fraumeni** (LFS). Como o gene supressor tumoral *TP53* que codifica a proteína p53 está inativado nas formas esporádicas de muitos dos cânceres encontrados na LFS, *TP53* foi considerado um candidato para o gene defeituoso na LFS. A análise do DNA de várias famílias com LFS confirmou esta hipótese. Os membros afetados de mais de 70% das famílias com LFS de fato possuíam uma forma mutante do gene *TP53* como uma mutação de linhagem germinativa. Assim, LFS é uma forma extrema de um grupo de cânceres que ocorrem tanto na forma esporádica quanto na forma familiar. Como visto também no retinoblastoma, uma das duas mutações necessárias para inativar o gene *TP53* está presente na linhagem germinativa na LFS familiar, enquanto na forma esporádica ambas as mutações são eventos somáticos.

A proteína p53 é uma proteína de ligação ao DNA que parece ser um componente importante da resposta celular aos danos no DNA. Além de ser um fator de transcrição que ativa a transcrição de genes que param a divisão celular e permitem o reparo de danos ao DNA, a p53 parece estar envolvida na indução da apoptose nas células que sofreram danos irreparáveis no DNA. Portanto, a perda de função de p53 permite que as células com DNA danificado sobrevivam e se dividam, propagando, assim, mutações potencialmente oncogênicas.

Neurofibromatose, Tipo 1

A NF1 é um distúrbio autossômico dominante relativamente comum, que afeta primariamente o sistema nervoso periférico e em geral é caracterizado por grandes números de neurofibromas (ver Cap. 5). Embora estes crescimentos sejam benignos, uma minoria de pacientes com NF1 também apresenta uma incidência aumentada de malignidades, tais como neurofibrossarcoma, astrocitoma, cânceres de células de Schwann e CML infantil. O crescimento celular anormal observado na NF1 sugere que o gene normal possa funcionar na regulação da divisão celular no tecido neural.

O gene *NF1* foi mapeado no braço longo proximal do cromossomo 17 por estudos de ligação familiar e subseqüentemente foi clonado pela aplicação de várias estratégias de clonagem posicional apresentadas no Cap. 8. A inspeção da seqüência do gene *NF1* e seu produto proteico demonstraram uma homologia significativa a proteínas que ativam a atividade GTPase do produto oncogênico *RAS* (ver mais atrás). Este achado sugere forte-

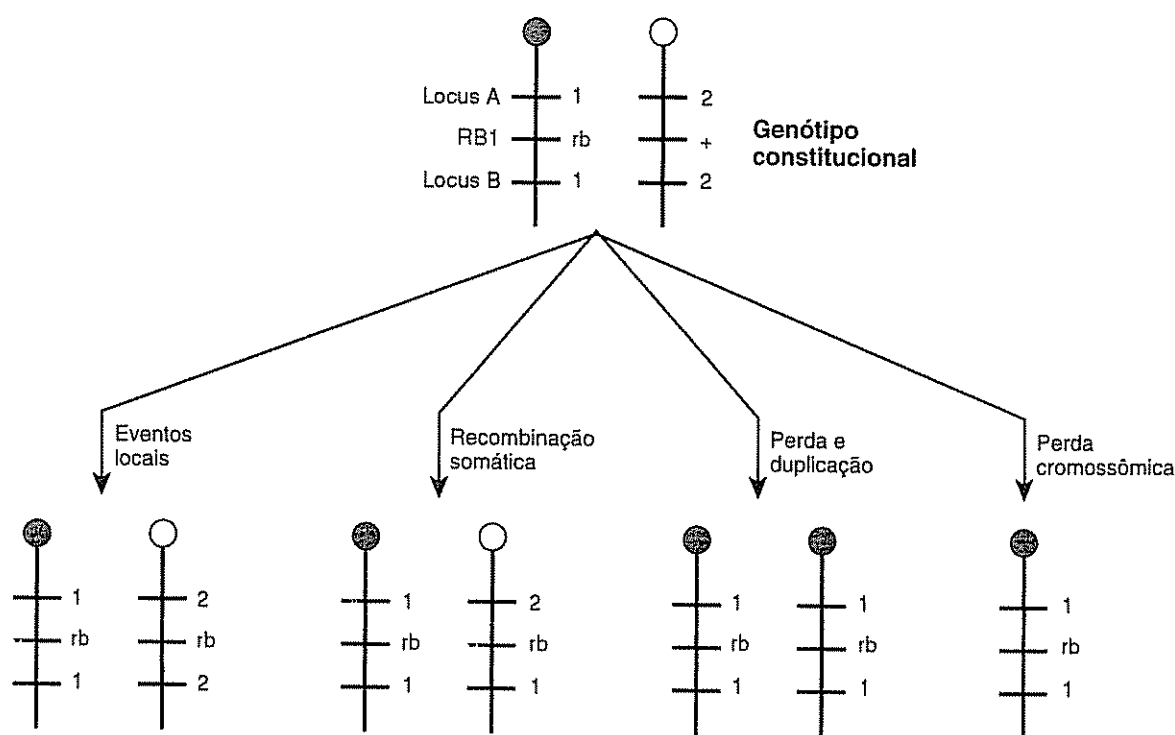



Fig. 16.9 Os mecanismos cromossômicos que podem levar a uma perda de heterozigose de marcadores de DNA no gene supressor tumoral — ou perto dele — em uma pessoa heterozigota para uma mutação herdada na linhagem germinativa, ilustrado no caso do gene do retinoblastoma no cromossomo 13q. Os eventos locais, tais como mutação, conversão gênica ou silenciamento transcricional, entretanto, podem causar perda de função de ambos os genes RB1 sem produzir LOH. RB1 + é o alelo normal e rb é o alelo mutante.

mente que o produto normal de *NF1* interage com um membro da família gênica *RAS* para regular a atividade proliferativa em células normais. O gene mutante *NF1* pode, então, falhar no que diz respeito a regular o crescimento nas células normais das quais se derivam os neurofibromas, levando a um crescimento impróprio e à formação de tumor.

Este modelo sugere que *NF1* seja um gene supressor tumoral. Por analogia com outras mutações gênicas de supressores tumorais herdados de forma dominante, seria necessária a perda ou a inativação do alelo normal restante no locus *NF1* para explicar o desenvolvimento de tumores nos pacientes com NF1. Em alguns casos de tumores malignos de célula de Schwann e leucemia mielóide juvenil, mas não em todos, demonstrou-se LOH do alelo normal de *NF1* nos tecidos tumorais, mas não nos tecidos vizinhos. O achado de LOH para o gene normal *NF1* em alguns destes tumores não exclui o papel de mutações múltiplas em outros genes levando a uma divisão celular desregulada (ver Fig. 16.1).

Câncer de Mama Familiar Devido a Mutações em BRCA1 e BRCA2

O câncer de mama é comum. Os estudos epidemiológicos baseados em populações mostraram que até 10% de todas as mulheres nos EUA desenvolverão câncer de mama durante a vida. O câncer de mama há muito foi reconhecido como tendo um forte componente genético. O risco de uma mulher desenvolver câncer de mama é aumentado em até três vezes se um parente em primeiro grau for afetado e em até 10 vezes se mais de um parente em primeiro grau for afetado. Estes riscos familiares aumentam ainda mais se o início da doença no parente em primeiro grau afetado tiver sido aos 40 anos de idade ou menos (Fig. 16.11). Embora até 20% de todos os casos de câncer de mama possam ter um componente genético significativo como parte de um modo de herança poligênico ou multifatorial (ver Cap. 15), uma pequena proporção de casos parece se dever a uma predisposição mendeliana herdada dominantemente ao câncer de

Quadro 16-5

Exemplos de Regiões Cromossômicas que Apresentam Freqüente LOH Repetida em Tumores Particulares

Região Cromossômica	Distúrbio(s)	Gene Supressor Tumoral Associado
1q	Carcinoma de mama	Desconhecido
3p	Carcinoma de pequena célula do pulmão	Desconhecido
5q	Polipose familiar do cólon; carcinoma colorretal	*APC*
13q	Retinoblastoma; carcinoma de mama; osteossarcoma	*RB1*
17p	Carcinoma colorretal; carcinoma de mama	*TP53*
18q	Carcinoma colorretal	*DCC*

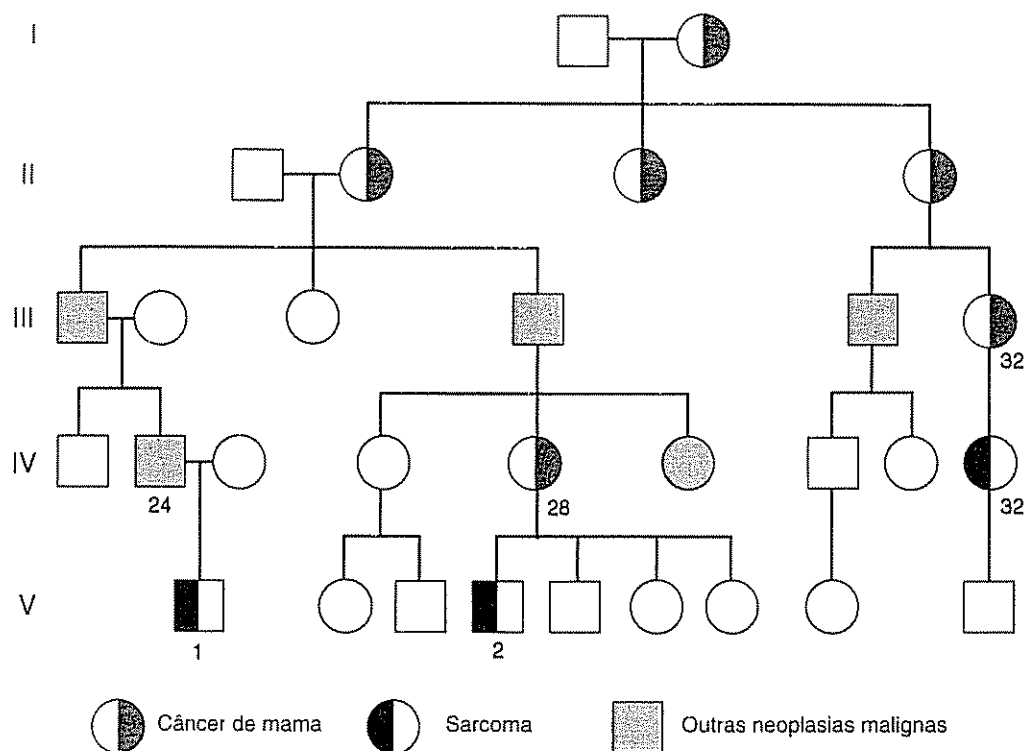



Fig. 16.10 Um heredograma da síndrome de Li-Fraumeni, no qual ocorreram câncer de mama, sarcoma e outros tumores malignos São mostradas as idades de diagnóstico. (Redesenhado de Li F P [1988] Cancer families: Human models of susceptibility to neoplasia — the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture Cancer Res 48:5381-5386)

mama. Estas famílias compartilham características de câncer familiar (em oposição ao esporádico): várias pessoas afetadas na família, idade precoce de início e doença bilateral freqüente.

Os estudos de ligação genética nas famílias com câncer de mama familiar de início precoce levaram à descoberta de mutações em dois genes que aumentam a suscetibilidade ao câncer de mama: *BRCA1*, no cromossomo 17q21, e *BRCA2*, no cromossomo 13q12.3. Juntos, estes dois loci são responsáveis por cerca de metade e um terço do câncer de mama familiar autossômico, respectivamente, mas por menos de 5% de todos os cânceres de mama na população. Hoje, muitos alelos mutantes de ambos os genes já foram catalogados. As mutações em *BRCA1* e *BRCA2* também estão associadas a um aumento significativo no risco de câncer ovariano nas mulheres heterozigotas. As mutações em *BRCA2*, mas não em *BRCA1*, também são responsáveis por 10% a 20% de todos os casos de câncer de mama *masculino*, uma doença rara que afeta menos de 0,1% dos homens.

Os produtos gênicos de *BRCA1* e *BRCA2* são proteínas nucleares contidas dentro do mesmo complexo multiproteico. Este complexo foi implicado na resposta celular às quebras bifilamentares do DNA, tal como normalmente ocorre durante a recombinação homóloga ou anormal como resultado de danos ao DNA. Como se poderia esperar de qualquer gene supressor tumoral, o tecido tumoral das heterozigotas para mutações em *BRCA1* e *BRCA2* demonstram LOH com perda do alelo normal.

Penetrância das Mutações *BRCA1* e *BRCA2*. A detecção pré-sintomática de mulheres em risco de desenvolver câncer de mama como resultado de algum destes genes de suscetibilidade é um objetivo importante das pesquisas atuais, tanto em casos familiares quanto no grande número de casos esporádicos. Para fins de tratamento e consulta genética da paciente, seria extremamente benéfico conhecer o risco durante a vida para o desenvolvimento de câncer de mama em pacientes portadoras de determinadas mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, comparado com o risco na população em geral (Fig. 16.12). Os estudos iniciais mostraram um risco de mais de 80% de câncer de mama aos 70 anos em mulheres heterozigotas para mutações *BRCA1* e *BRCA2*. Estas estimativas foram baseadas no risco de desenvolver câncer em parentes femininos dentro de famílias avaliadas porque o câncer de mama já havia ocorrido muitas vezes nos membros familiares. Isto é, a mutação *BRCA1* ou *BRCA2* era altamente penetrante nas portadoras. Quando estimativas similares de risco foram feitas em estudos baseados em populações, entretanto, nos quais as mulheres portadoras de *BRCA1* e *BRCA2* não foram selecionadas porque eram membros de famílias nas quais já haviam ocorrido muitos casos de câncer de mama, as estimativas de risco foram menores e variaram de 45% a 60% aos 70 anos. A discrepância entre os estudos baseados em famílias com múltiplas ocorrências da doença decorrentes da alta penetrância dos alelos mutantes e os estudos de mulheres identificadas por triagem populacional e não por história familiar sugere que outros fatores genéticos ou ambientais podem ter um papel na penetrância final das mutações *BRCA1* e *BRCA2* em mulheres heterozigotas para estas mutações.

Câncer de Cólon Familiar

Polipose Familiar do Cólon. O câncer colorretal, uma malignidade do epitélio do cólon e do reto, é uma das formas mais comuns de câncer. Ele afeta mais de 150.000 pessoas por ano apenas nos EUA e é responsável por cerca de 15% de todos os cânceres. Uma pequena proporção de casos de câncer de cólon deve-se à condição autossômica dominante **polipose familiar do cólon** (também conhecida como polipose adenomatosa familiar

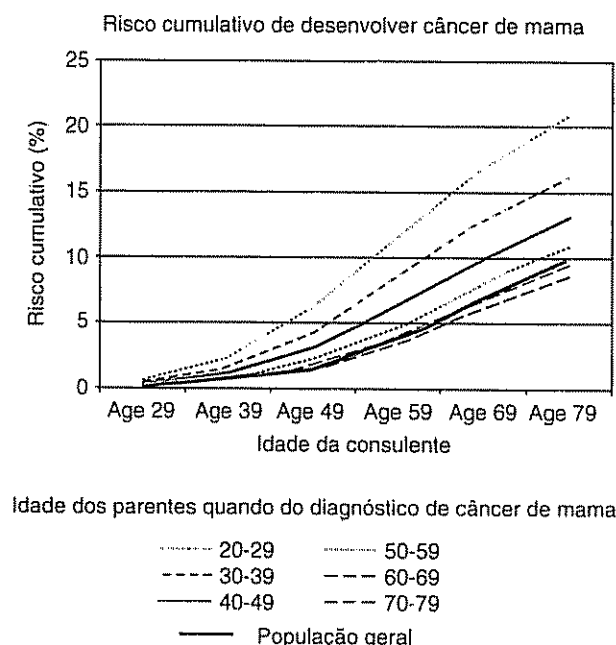



Fig. 16.11 Riscos de câncer de mama. Risco cumulativo, com a idade, de uma consulente que desenvolveu câncer de mama quando um parente em primeiro grau teve câncer de mama. O risco para a consulente aumenta diretamente com sua idade e inversamente com a idade na qual o parente em primeiro grau foi primeiro diagnosticado com câncer de mama. (Adaptado de Claus E. B., Risch N., Thompson W. D. [1994] Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. Cancer 73: 643-651.)

ou FAP) e sua subvariante, a síndrome de Gardner. A FAP tem uma incidência de cerca de 1 em 10.000.

Nos heterozigotos para FAP, vários pólipos adenomatosos, que em si são crescimentos benignos, desenvolvem-se no cólon durante as primeiras duas décadas de vida. Em quase todos os casos, um ou mais pólipos tornam-se malignos. A remoção cirúrgica do cólon (colectomia) impede o desenvolvimento da malignidade. Como este distúrbio é autossômico dominante, os parentes de pessoas afetadas devem ser examinados periodicamente por colonoscopia. O gene responsável, *APC*, foi isolado por clonagem posicional após o locus da doença ser mapeado no cromossomo 5q, tanto por estudos genéticos nos familiares afetados (ver Cap. 8) quanto pela demonstração de perda de heterozigose nos tumores do cólon. A síndrome de Gardner também se deve a mutações em *APC* e é, portanto, alélica à FAP. Os pacientes com síndrome de Gardner têm, além dos pólipos adenomatosos com transformação maligna vistos na FAP, outras anomalias, incluindo osteomas da mandíbula e desmóideos, que são tumores que surgem nos músculos da parede abdominal.

O *APC* codifica uma proteína citoplasmática que regula a proteína bifuncional conhecida como β-catenina. A β-catenina serve tanto como ligação entre a parte citoplasmática das moléculas transmembranares de adesão celular, tais como as caderinas, e o citoesqueleto de actina quanto como ativadora da transcrição (Fig. 16.13). Sob condições normais, quando a camada epitelial colônica está intata e a proliferação celular não é necessária, a maioria das β-cateninas está presente em um grande complexo proteico com a E-caderina. O *APC* induz a proliferação e a subseqüente degradação de qualquer β-catenina não-ligada, mantendo assim os níveis de β-catenina na célula baixos. A perda de *APC* leva ao acúmulo de β-catenina citoplasmática livre, que é translocada para o núcleo e ativa a transcrição de genes de proliferação celular, incluindo *MYC*, o mesmo gene que é hiperexpresso no linfoma de Burkitt.

Câncer Hereditário Não-polipose do Cólon. Cerca de 2% a 4% dos casos de câncer de cólon são atribuíveis a um grupo de síndromes de câncer familiar conhecido como **câncer hereditário não-polipose do cólon** (HNPCC). O HNPCC é caracterizado por herança autossômica dominante de câncer de cólon que ocorre durante a vida adulta, mas em uma idade relativamente jovem e sem os pólipos adenomatosos vistos na FAP. Os heterozigotos masculinos para um gene mutante HNPCC têm um risco de cerca de 90% de desenvolver câncer do cólon durante a vida. As mulheres heterozigotas têm um risco um pouco menor, de cerca de 70%, mas têm aproximadamente 40% de risco de câncer endometrial. Também existem riscos adicionais, de 10% a 20%, de câncer das vias biliares e urinárias e de ovário.

O HNPCC é um grupo de cinco síndromes familiares similares (HNPCC1 até HNPCC5) causadas por mutações em um dos cinco genes diferentes de reparo de DNA responsáveis por reparar segmentos de DNA nos quais o pareamento correto de bases de DNA (A com T, C com G) foi violado (ver Caps. 6 e 8). Estes genes, conhecidos como *MLH1*, *MSH2*, *PMSL1*, *PMSL2* e *MSH6*, são todos designados por sua similaridade de seqüência a um grupo de genes microbianos que codificam as enzimas res-

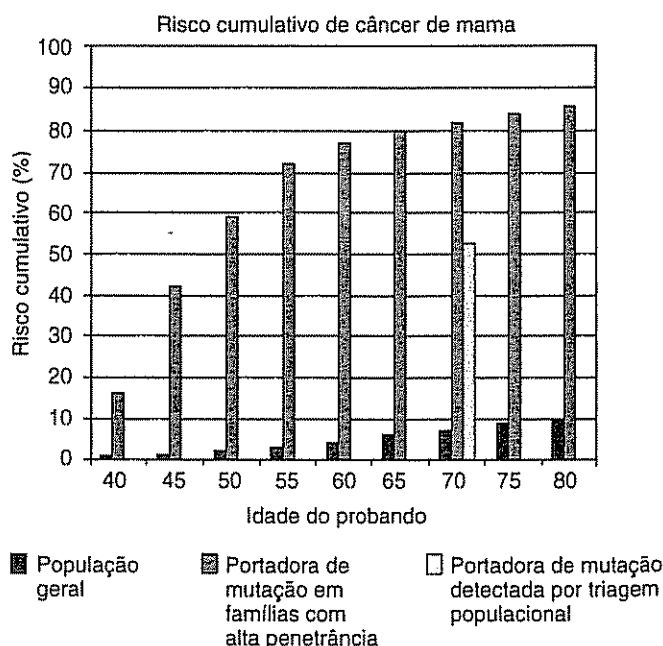



Fig. 16.12 Risco cumulativo de câncer de mama, com a idade, de mulheres portadoras de mutação em BRCA1 ou BRCA2, calculado usando-se dados de famílias com alta penetrância para a mutação (*barras vermelhas*). O risco é comparado com o risco de câncer de mama na população em geral (*barras pretas*), bem como com o risco estimado (± 52%) aos 70 anos para câncer de mama em uma portadora de mutação BRCA1 ou BRCA2 identificada por triagem populacional (*barra rosa*) e não em famílias com alta penetrância. Ver o texto. (Adaptado de King M. C., Rowell S., Love S. M. [1993] Inherited breast and ovarian cancer. What are the risks? What are the choices? JAMA 269:1775-1980; Ford D., Easton D. F., Stratton M., *et al* [1998] Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet 62:676-689; Brody L. C., Biesecker B. B. [1998] Breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. Medicine [Baltimore] 77:208-226.)

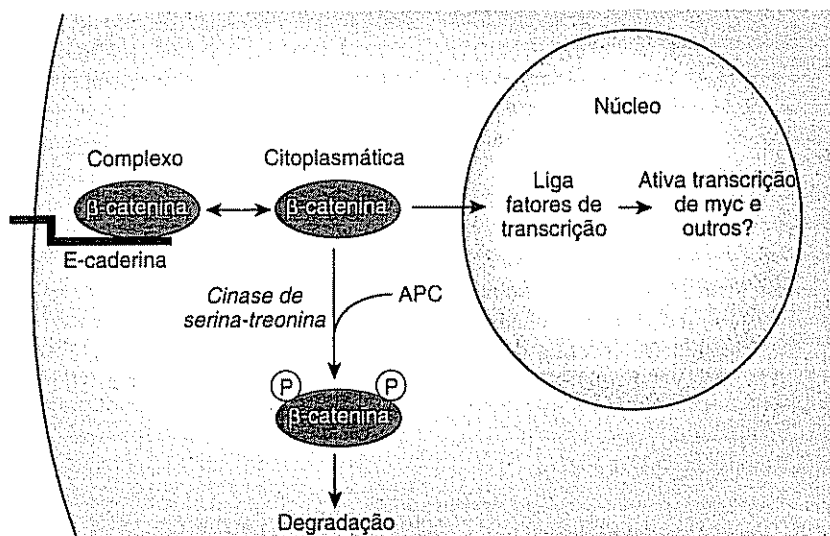



Fig. 16.13 Diagrama esquemático da interação do produto do gene *APC* e β-catenina. A β-catenina forma um complexo com a molécula de adesão celular E-catenina. A β-catenina também existe livre no citoplasma, onde é marcada pelo produto do gene *APC* para degradação por fosforilação por uma cinase de serina/treonina, ou entra no núcleo e ativa a transcrição de genes oncogênicos, tais como o *MYC*.

ponsáveis pelo reparo de mau pareamento entre os filamentos complementares de DNA. Embora todos os cinco genes estejam implicados no HNPCC em famílias diferentes, *MLH1* e *MSH2* juntos são responsáveis por cerca de 60% a 70% do HNPCC, enquanto os outros foram encontrados em apenas alguns poucos pacientes raros e estão associados a um grau menor de deficiência de reparo de mau pareamento. Os genes HNPCC são protótipos de genes supressores tumorais de manutenção (*caretaker*).

Como em outros genes supressores tumorais, o padrão de herança autossômica dominante de HNPCC surge pela herança de um alelo mutante seguido de mutação ou inativação do alelo normal restante em uma célula somática. No nível celular, o fenótipo mais marcante das células que não têm ambos os alelos destes genes é um aumento enorme de mutações de ponto e na instabilidade dos segmentos de DNA contendo repetições de seqüências simples, tais como $(dA)_n$ ou polimorfismos de microssatélite (ver Cap. 6). O DNA microssatélite é tido como sendo particularmente vulnerável ao mau pareamento porque o desalinhamento do filamento sendo sintetizado no filamento molde podem ocorrer mais prontamente quando curtas repetições de DNA em tandem são sintetizadas. Tal instabilidade, chamada de fenótipo **erro de replicação positivo** (ou **RER+**), ocorre em duas ordens de magnitude de freqüência maior nas células que não têm ambas as cópias de um gene de reparo de mau pareamento. O fenótipo RER+ é facilmente visto no DNA como três, quatro ou mesmo mais alelos de um polimorfismo de microssatélite em um único DNA tumoral de uma pessoa (Fig. 16.14). Avalia-se que as células que não têm ambas as cópias de um gene de reparo de mau pareamento podem levar 100 000 mutações dentro de repetições simples pelo genoma. Mutações oncogênicas secundárias à instabilidade de repetição podem ocorrer em qualquer número de genes: pelo menos dois destes genes foram isolados e caracterizados. O primeiro é *APC*, cuja função normal e papel na FAP já foram descritos. O segundo é o gene que codifica o receptor de fator beta II transformante de crescimento (TGF-βII). TGF-βII, uma cinase de serina/treonina que tem uma atividade de controle de crescimento pela fosforilação de moléculas sinalizadoras seguintes, tem um trecho de 10 adeninas que codificam três lisinas em sua seqüência codificante. A deleção de uma ou mais destas adeninas em ambos os alelos do gene ocorre com alta freqüência nas células RER+ e resulta em mudança de matriz de leitura e perda de função deste receptor. Como ilustrado de modo geral na Fig. 16.1, as mutações oncogênicas decorrentes de instabilidade de repetição podem produzir muitas das mutações que permitem que uma célula normal se torne totalmente maligna, a célula cancerosa metastática.

Linfoma Hereditário com Perda de Expressão de Genes Supressores Tumorais Pró-apoptóticos

A **síndrome linfoproliferativa auto-imune** (ALPS) é uma rara condição autossômica dominante caracterizada por intensa linfadenopatia e esplenomegalia, particularmente na infância, e desenvolvimento de fenômenos auto-imunes, tais como trombocitopenia

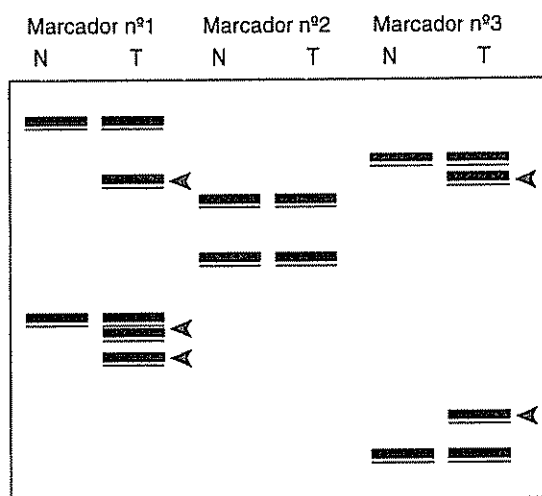



Fig. 16.14 Eletroforese em gel de três marcadores polimórficos de microssatélites diferentes em amostras normal (N) e tumoral (T) de um paciente com uma mutação em MSH2 e instabilidade de microssatélite. Embora o marcador nº 2 não apresente diferença entre os tecidos normal e tumoral, a genotipagem com marcadores nºs 1 e 3 revela alelos extras, alguns menores e alguns maiores que os alelos presentes no tecido normal (*setas vermelhas*).

mediada por anticorpo ou anemia hemolítica. Embora as manifestações desta condição sejam primariamente as de auto-imunidade, os linfomas de célula B e de Hodgkin foram descritos com uma freqüência aumentada de 14 e 50 vezes, respectivamente.

Na ALPS, a anomalia primária está no mecanismo de apoptose do linfócito mediado pelo receptor fas e seu ligando, fas-ligando. Tanto fas-ligando quanto fas são homotrímeros. As mutações dominantes negativas (ver Cap. 12) em um alelo de ambos os genes que codificam estas moléculas causam perda de função do receptor ou seu ligando, resultando em deficiência de sinalização apoptótica e intensa expansão de linfócitos T imaturos, conhecidos como células duplo-negativas (porque não têm tanto os marcadores de superfície celular de T-*helper* [T4] quanto de T-supressor [T8]). Não se sabe exatamente como este defeito na apoptose de linfócitos T pode levar a um aumento de freqüência de vários tipos de linfomas, mas pode ser em função de um aumento acentuado do número de células que podem servir como alvos para mutação e, portanto, transformação maligna.

Síndromes de Instabilidade Cromossômica

Quatro síndromes raras autossômicas recessivas de instabilidade cromossômica mencionadas no Cap. 9, **ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom** e **xeroderma pigmentoso**, estão associadas a um risco aumentado de malignidade, particularmente leucemia, ou, no caso do xeroderma pigmentoso, cânceres de pele nas áreas expostas ao sol (ver Quadro 9.6). Clinicamente, as radiografias devem ser usadas com extrema cautela, ou nunca, em pacientes com ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi e síndrome de Bloom. Além disso, a exposição à luz do sol deve ser evitada em pacientes com xeroderma pigmentoso.

Embora a suscetibilidade a danos cromossômicos e de DNA pelos raios X, pela luz ultravioleta ou por alguns agentes químicos e a suscetibilidade à malignidade vista nestas síndromes não estejam totalmente explicadas, os genes para muitos delas foram isolados e demonstrou-se que codificavam proteínas intimamente envolvidas no reparo de DNA e na manutenção da integridade cromossômica e genômica. Assim, os genes que são defeituosos nas síndromes de instabilidade cromossômica podem ser vistos como genes supressores tumorais de manutenção (*caretaker*) (ver Quadro 16.1).

Embora as síndromes de instabilidade cromossômica sejam distúrbios raros autossômicos recessivos, os heterozigotos para estes defeitos gênicos são muito mais comuns e também podem ter um risco aumentado de malignidade. As mulheres heterozigotas que são parentes de homozigotos com ataxia telangiectasia podem ter um risco de ter câncer de mama de quatro a seis vezes maior, se comparadas com esposas controle, por exemplo. Se este achado for definitivamente confirmado, tornará possível identificar, pré-clinicamente, uma classe de pessoas com uma enorme predisposição genética a pelo menos um dos cânceres comuns.

Perda de Genes Supressores Tumorais em Câncer Esporádico

MUTAÇÕES TP53 EM CÂNCERES ESPORÁDICOS

Embora a LPS, que é causada pela herança de mutações na linhagem germinativa em *TP53*, seja uma síndrome familiar rara, as mutações somáticas que causam uma perda de função de ambos os alelos de *TP53* são uma das alterações genéticas mais comuns vistas no câncer esporádico. As mutações do gene *TP53* ou a deleção do segmento do cromossomo 17p (banda p13.1) que inclui *TP53*, ou ambos, são freqüente e repetidamente vistas em uma ampla gama de cânceres esporádicos, incluindo de mama, ovário, bexiga, cervical, esofagiano, colorretal, pele e carcinomas pulmonares, glioblastoma do cérebro, sarcoma osteogênico e carcinoma hepatocelular. O papel central de p53 como supressor tumoral foi destacado pela designação de "Molécula do Ano" pela revista *Science*, em 1993.

BRCA1 E BRCA2 NO CÂNCER DE OVÁRIO E MAMA ESPORÁDICOS

As mutações em *BRCA1* e *BRCA2* foram encontradas em uma pequena porcentagem de pacientes com câncer de ovário ou de mama sem história familiar. Em alguns casos, as mutações eram constitucionais, mas nenhuma história familiar era aparente. Em outros, a análise do próprio tumor revelou uma mutação somática em um alelo de *BRCA1* ou *BRCA2* juntamente com LOH para a região genômica correspondente contendo o outro alelo normal. A hibridização comparativa (ver Cap. 4) foi um método particularmente poderoso usado para triar LOH em tecido de tumor de mama *versus* tecido normal da mesma mulher. LOH foi encontrada em várias regiões cromossômicas, incluindo 1p, 3p, 11p, 13q, 16q e 17p, o que sugere que podem existir muitos genes importantes para a progressão do tumor de mama. Embora o gene no cromossomo 17p provavelmente seja o *TP53*, os outros genes não foram identificados.

CÂNCER HEREDITÁRIO NÃO-POLIPOSE DE CÓLON E GENES DE POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR NO CÂNCER DE CÓLON ESPORÁDICO

Em contraste com a baixa freqüência com a qual *BRCA1* e *BRCA2* são encontrados mutados na maioria dos cânceres de mama esporádicos, há uma ampla evidência que apóia um grande envolvimento dos genes responsáveis pelo câncer de cólon familiar, tais como HNPCC e FAP, no câncer de cólon esporádico (Fig. 16.15). Em quase 70% dos pólipos adenomatosos das pessoas sem FAP, o modelo de dois eventos para a tumorigênese foi confirmado pelo achado da perda de ambas as cópias de *APC* no adenoma, mas não nos tecidos normais vizinhos. Nos 30% restantes, nos quais *APC* é normal, as mutações em β-catenina que bloqueiam sua fosforilação e degradação foram encontradas em quase metade. O fenótipo RER+, com a associada mutação ou silenciamento transcricional de ambos os alelos de um ou mais dos genes de reparo de mau pareamento, foi relatado em até 12% do câncer de cólon esporádico nas pessoas sem uma história familiar óbvia de HNPCC. As mutações ativadoras de um membro da família do gene *RAS* (*KRAS*), bem como a perda de ambas as cópias de *TP53*, também são vistas freqüentemente no câncer de cólon esporádico. A perda de expressão de um gene em 18q21, chamado de *DCC* (para deletado no carcinoma de cólon), é observada em mais de 70% dos casos de câncer colorretal. Este gene codifica um receptor para moléculas envolvidas na orientação axonal durante o desenvolvimento normal do sistema nervoso. Em outros 15% de cânceres de cólon esporádicos, o gene *SMAD4*, que está envolvido na sinalização posterior ao receptor TGFβII, está mutado.

Tão importante quanto os defeitos no reparo de mau pareamento são no HNPCC e alguns cânceres de cólon esporádicos, a maioria dos cânceres de cólon esporádicos têm o fenótipo RER+. Estes tumores geralmente têm mutações cromossômicas e genômicas que refletem defeitos seja no reparo de quebras bifilamentares seja na manutenção da fidelidade de como os cromossomos se alinham no fuso mitótico durante a mitose. Os defeitos no primeiro geram translocações cromossômicas, enquanto as anomalias na última podem levar à não-disjunção e à

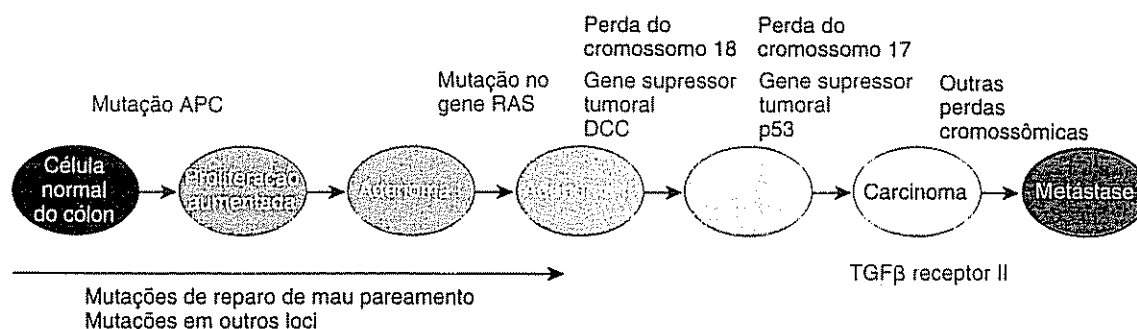



Fig. 16.15 Estágios da evolução do câncer de cólon, servindo como um modelo mais geral para a evolução do câncer (ver Fig 16 1) Os graus crescentes de anomalia estão associados à perda seqüencial de genes supressores tumorais de vários cromossomos e à ativação do proto-oncogene *RAS*, com ou sem o defeito concomitante no reparo de mau pareamento A ordem de eventos em geral é como mostrada aqui, mas nem sempre. Por exemplo, o câncer esporádico com reparo anormal de mau pareamento é menos comum que os cânceres sem reparo anormal, mas, quando presente, pode funcionar juntamente com uma via um pouco diferente, mas paralela, levando à malignidade como o ponto final comum (Adaptado de Kinzler K W , Vogelstein B [1996] Lessons from hereditary colorectal cancer Cell 87:159-170)

aneuploidia. Em resumo, existem muitos modos para que a divisão celular e o crescimento se desregulem, e muitos outros sem dúvida estão por ser descobertos e elucidados.

PROGRESSÃO TUMORAL POR EVOLUÇÃO CLONAL

Nas síndromes de câncer familiar, o padrão de herança indica que um defeito em um único gene, herdado na linhagem germinativa, é capaz de iniciar um processo em várias etapas que leva ao câncer. Embora muitos destes mesmos genes sejam encontrados mutados nos cânceres esporádicos, tais cânceres podem levar décadas para se desenvolver a ponto de serem clinicamente evidentes e, portanto, é muito mais difícil determinar qual destas mutações de fato iniciou o processo maligno. Além disso, os paradigmas usados para explicar as síndromes hereditárias de câncer, nas quais o desenvolvimento de malignidade requer a ativação de um proto-oncogene, a perda de função de ambos os alelos de um gene supressor tumoral ou a desregulação de processos apoptóticos, são necessariamente muito simplistas. A formação de um tumor é claramente um processo em várias etapas, que envolve uma sucessão de mudanças genéticas na população de células tumorais em evolução (ver Fig. 16.1). As etapas para a malignidade também podem seguir uma única via linear porque mudanças genéticas diferentes, ativadas por defeitos seja no reparo do DNA seja na manutenção da integridade do genoma, podem ocorrer como ramificações de sublinhagens malignas durante a evolução e a progressão do tumor.

Mudanças Citogenéticas no Câncer

Aneuploidia e Aneussomia

As mudanças citogenéticas são marcos do câncer, particularmente nos estágios mais avançados ou malignos do desenvolvimento do tumor. Tais alterações citogenéticas sugerem que um elemento importante da progressão do câncer inclui defeitos nos genes envolvidos na manutenção da estabilidade cromossômica e na integridade e segregação mitótica precisa.

Inicialmente, a maioria dos estudos citogenéticos da progressão tumoral foi feita nas leucemias, pois as células tumorais eram passíveis de ser cultivadas e cariotipadas por métodos padrão. Por exemplo, quando a CML, com o cromossomo 9;22 Philadelphia, evolui de uma fase crônica tipicamente indolente para uma grave crise blástica que ameaça a vida, podem haver várias anomalias citogenéticas adicionais, incluindo mudanças numéricas ou estruturais, tais como uma segunda cópia do cromossomo 9;22 translocado ou um isocromossomo para 17q. Nos estágios avançados de outras formas de leucemia, outras translocações são comuns.

A hibridização genômica comparativa (CGH) (ver Cap. 4) permitiu que os citogeneticistas de câncer estudassem os tecidos tumorais quanto às mutações genômicas e cromossômicas sem que tivessem de fazer culturas das células tumorais para cariotipagem. Quando as células tumorais puderam ser cariotipadas, o cariótipo espectral (ver Caps. 4 e 9) também revelou uma gama maior de anomalias do que aquelas visíveis pelos métodos anteriores de cariotipagem e identificação cromossômica por bandeamento (ver Fig. 9.5, *encarte colorido*). Uma vasta gama de anomalias é vista em todos os cânceres. Algumas anomalias são vistas apenas ocasionalmente em algumas amostras de tumor e podem ser anomalias aleatórias, enquanto outras são encontradas repetidamente nos cânceres do mesmo tipo histológico. Isto sugere que estas mutações estão envolvidas de algum modo na evolução da malignidade. Outras mudanças são encontradas apenas em metástases de um câncer, mas não no tumor primário original. Um foco das pesquisas de câncer é a definição citogenética e molecular destas anomalias, muitas das quais já se sabe que estão relacionadas a proto-oncogenes ou genes supressores tumorais e, supostamente, permitem uma expressão acentuada de proto-oncogenes ou representam perda de alelos de genes supressores tumorais.

Amplificação Gênica

Além de translocações e outros rearranjos, uma outra anomalia citogenética vista em muitos cânceres é a **amplificação gênica**, um fenômeno no qual existem muitas cópias adicionais de um segmento do genoma presente na célula. A amplificação gênica é comum em muitos cânceres, incluindo o neuroblastoma, o carcinoma de célula escamosa da cabeça e do pescoço, o câncer colorretal e os glioblastomas malignos do cérebro. Os segmentos amplificados do DNA são prontamente detectados por CGH e surgem como dois tipos de mudanças citogenéticas na análise cromossômica rotineira: os **diminutos duplos** (cromossomos acessórios muito pequenos) e as **regiões de coloração homogênea** (HSRs), que normalmente não são bandeadas e contêm múltiplas cópias amplificadas de um segmento em particular do DNA. Ain-

da é pouco compreendido como e por que ocorrem os diminutos duplos e as HSRs, mas sabe-se que as regiões amplificadas incluem cópias extras de proto-oncogenes, tais como os genes que codificam myc, ras e o receptor de fator de crescimento epitelial, que estimulam o crescimento celular ou são bloqueadores de apoptose, ou ambos. Por exemplo, a amplificação do proto-oncogene *MYCN* que codifica n-myc é um importante indicador clínico de prognóstico no câncer infantil **retinoblastoma** (Fig. 16.6). *MYCN* é amplificado mais de 200 vezes em 40% dos estágios avançados do neuroblastoma. A despeito de um tratamento agressivo, apenas 30% dos pacientes com a doença avançada sobrevivem por 3 anos. Em contraste, a amplificação *MYCN* é encontrada em apenas 4% do neuroblastoma de estágio inicial, e a sobrevida por 3 anos é de 90%. A amplificação dos genes codificando os alvos dos agentes quimioterápicos também foi implicada como um mecanismo de desenvolvimento de resistência a drogas em pacientes previamente tratados com quimioterapia.

CÂNCER E AMBIENTE

O risco de câncer mostra uma variação significativa entre populações diferentes e dentro da mesma população em ambientes diferentes. Por exemplo, o câncer gástrico é quase três vezes tão comum entre os japoneses no Japão quanto entre os japoneses que vivem no Havaí ou em Los Angeles. Assim, parece que uma proporção considerável do risco deve depender da exposição a mutágenos e carcinógenos do ambiente. A natureza dos carcinógenos ambientais, a avaliação do risco adicional associado à exposição e os meios de proteger a população de tais ameaças são assuntos de grande preocupação pública.

O tema deste capítulo é que o câncer é uma doença genética, mas não há contradição em considerar o papel do ambiente na carcinogênese. Os agentes ambientais atuam como mutágenos que causam mutações somáticas. As mutações somáticas, por sua vez, são responsáveis pela carcinogênese. De acordo com algumas estimativas baseadas principalmente em dados dos resultados das bombas de Hiroshima e Nagasaki, até 75% do risco de câncer pode ser de origem ambiental.

Radiação

Sabe-se que a radiação ionizante causa um aumento de risco de câncer. Os dados dos sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki e outras populações expostas mostram um longo período de latência, na faixa de 5 anos para a leucemia, mas de até 40 anos para alguns tumores. O risco depende da idade, sendo maior para as crianças com menos de 10 anos e para os idosos. Como já foi observado, a radiação é muito mais perigosa para pessoas com erros hereditários de reparo do DNA que para a população em geral. Todos nós estamos expostos em algum grau à radiação ionizante pela radiação ambiental (que varia muito de um local para outro), exposição médica e energia nuclear. Infelizmente, ainda existem grandes áreas de incerteza sobre a magnitude dos efeitos da radiação, especialmente a radiação de baixo nível, nos riscos de câncer.

Carcinógenos Químicos

O interesse no efeito carcinogênico das substâncias químicas data de pelo menos o século XVIII, quando se observou a alta incidência de câncer escrotal nos jovens limpadores de chaminés. Hoje em dia, há uma preocupação quanto a muitos carcinógenos químicos possíveis, especialmente o tabaco, os componentes da dieta, os carcinógenos industriais e os dejetos tóxicos. A documentação sobre o risco de exposição em geral é difícil, mas o nível de preocupação é tal que todos os clínicos devem ter um conhecimento sobre o assunto e devem ser capazes de distinguir os fatos bem-estabelecidos das áreas de incerteza e debate.

Uma área importante na qual os fatores genéticos e ambientais podem interagir para aumentar ou evitar os efeitos carcinogênicos das substâncias químicas é nos genes que codificam enzimas do metabolismo de drogas e substâncias exógenas. Uma classe de enzimas do metabolismo de drogas, codificadas pela família dos genes de **citocromo P450** (*CYP*) (das quais existem dúzias e talvez mesmo centenas no genoma humano), é responsável pela desintoxicação de substâncias exógenas. Vários genes *CYP* são polimórficos e são subjacentes ao metabolismo de drogas (ver discussão de farmacogenética no Cap. 12). Um po-

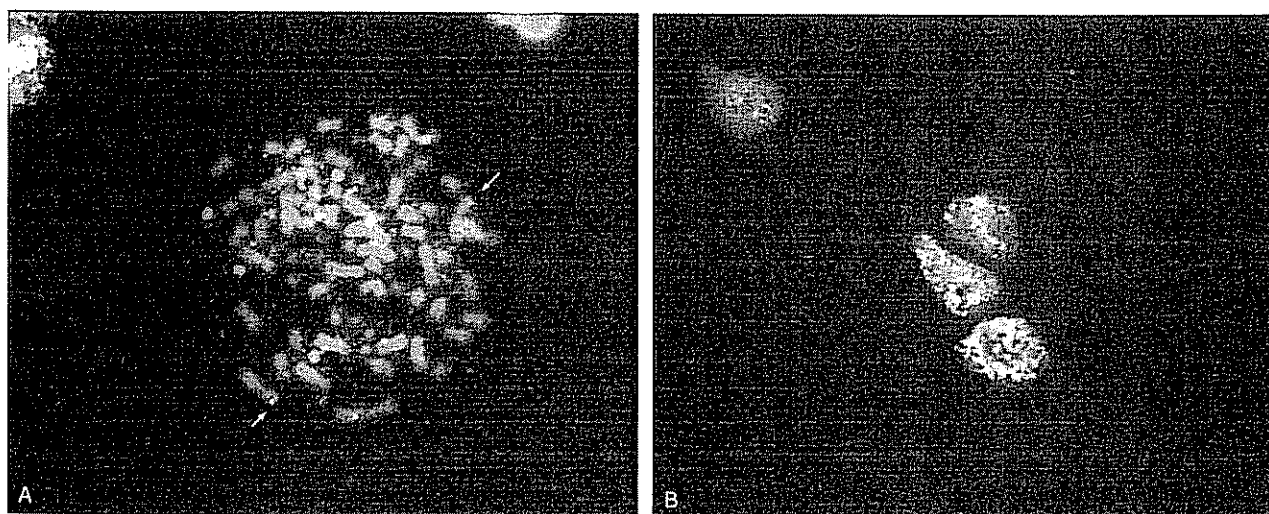



Fig. 16.16 Hibridização *in situ* de fluorescência com sonda *MYCN* em neuroblastoma avançado. A. Metáfase de uma célula tetraplóide de neuroblastoma mostrando diminutos duplos. A intensidade do sinal de fluorescência varia de acordo com o tamanho do diminuto duplo e o número de cópias de *MYCN* que contém. As setas apontam os sinais de fluorescência que surgem do locus normal *MYCN* no cromossomo 2p distal. B. Núcleo interfásico de células de neuroblastoma mostrando graus variados de intensidade de fluorescência que surge de cromossomos diminutos duplos. (Foto por cortesia de J. Biegel. Children's Hospital of Philadelphia.)

limorfismo genético bem-estudado foi associado à suscetibilidade ao câncer de pulmão. A enzima **aril hidrocarboneto hidroxilase** (AHH) é uma proteína induzível envolvida no metabolismo de hidrocarbonetos policíclicos, tais como os encontrados no fumo de cigarros. A AHH converte os hidrocarbonetos na forma epóxido, que é mais facilmente excretada pelo corpo, mas que também é carcinogênica. A extensão do metabolismo de hidrocarbonetos é geneticamente controlada e apresenta variação polimórfica na população normal. As pessoas que têm um alelo de alta "inducibilidade", particularmente os que são fumantes, parecem correr um risco aumentado de câncer de pulmão. Os dados indicam que o próprio fumo de cigarros induz a expressão do gene *CYP1A1* (que codifica AHH) nas pessoas com um alelo de alta "inducibilidade". Por outro lado, os homozigotos para o alelo recessivo de baixa "inducibilidade" parecem ser menos propensos a desenvolver câncer de pulmão, possivelmente porque sua AHH é menos efetiva no que diz respeito a converter os hidrocarbonetos em carcinógenos altamente reativos.

Um segundo polimorfismo da enzima citocromo P450, que controla a habilidade em metabolizar o composto debrisoquina (um agente bloqueador beta-adrenérgico), também foi associado a um aumento de suscetibilidade ao câncer de pulmão. Uma pequena proporção de pessoas é de "metabolizadores pobres" de debrisoquina e são homozigotas para um alelo recessivo no gene *CYP2D6* no cromossomo 22. Estas pessoas parecem ser mais resistentes aos efeitos carcinogênicos potenciais do fumo de cigarros ou carcinógenos pulmonares ocupacionais (tais como asbestos ou hidrocarbonetos aromáticos policíclicos). Os "metabolizadores amplos" (homozigotos para um alelo *CYP2D6*) têm um risco quatro vezes maior de câncer de pulmão que os "metabolizadores pobres". O risco aumenta 18 vezes entre as pessoas expostas rotineiramente a carcinógenos pulmonares. Uma associação similar foi relatada para o câncer de bexiga

Embora a base genética e bioquímica exata para as diferenças aparentes na suscetibilidade dentro da população normal ainda não tenham sido determinadas, estas associações podem ter significativas conseqüências na saúde pública e podem, eventualmente, indicar um modo de identificar as pessoas que são geneticamente predispostas ao desenvolvimento de câncer.

CONCLUSÃO

O câncer é um distúrbio genético no qual o controle da proliferação celular está perdido. O mecanismo básico em todos os cânceres é a mutação, seja na linhagem germinativa ou, com muito mais freqüência, nas células somáticas. Ainda resta muito a aprender sobre os processos genéticos da carcinogênese e sobre os fatores ambientais que podem alterar o DNA e assim levar à malignidade. É provável que novas descobertas sobre o papel fundamental das mudanças no DNA na carcinogênese levem, em um futuro próximo, a modos melhores e mais específicos de detecção precoce, prevenção e tratamento das doenças malignas.

Referências Gerais

Fearon ER (1999) Cancer progression. Curr Biol 9:R873–R875.

Fearon ER (1997) Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. Science 278:1043–1049.

Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87:159–170.

Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 386:761–763.

Knudson AG (1996) Hereditary cancer: Two hits revisited. J Cancer Res Clin Oncol 122:135–140.

Knudson AG (1997) Hereditary predisposition to cancer. Ann NY Acad Sci 833:58–67

Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science 278:1059–1063.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. Nature 396:643–649.

Mitelman F (1998) Catalogue of Chromosome Aberrations in Cancer, 6th ed. on CD-ROM. John Wiley & Sons, New York.

Nowell PC, Rowley JD, Knudson AG Jr (1998) Cancer genetics, cytogenetics—defining the enemy within. Nat Med 4:1107–1111

Offit K (1997) Clinical Cancer Genetics: Risk Counseling and Management. Wiley-Liss, New York.

Perera FP (1997) Environment and cancer: Who are susceptible? Science 278:1068–1073.

Vogelstein B, Kinzler KW (1998) The Genetic Basis of Human Cancer. McGraw Hill, New York.

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Burke W, Daly M, Garber J, et al (1997) Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer II. BRCA1 and BRCA2. JAMA 277:997–1003.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, et al (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. Nature 392:300–303.

Eshleman JR, Markowitz SD (1995) Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. Curr Opin Oncol 7:83–89.

Fearon ER, Dang CV (1999) Cancer genetics: Tumor-suppressor meets oncogene. Curr Biol 9:R62–R65.

Holt SE, Shay JW (1999) Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. J Cell Physiol 180:10–18.

Ivanovich JL, Read TE, Ciske DJ, et al (1999) A practical approach to familial and hereditary colorectal cancer. Am J Med 107:68–77.

Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. Nat Genet 21:163–167

Morin PJ (1999) β-catenin signaling and cancer. Bioessays 21:1021–1030.

Rowley JD (1990) The Philadelphia chromosome translocation: A paradigm for understanding leukemia. Cancer 65:2178–2184.

St John DJ, McDermott FT, Hopper JL, et al (1993) Cancer risk in relatives of patients with common colorectal cancer. Ann Intern Med 118:785–790.

Weinberg RA (1990) The genetic basis of cancer. Arch Surg 125:257–260.

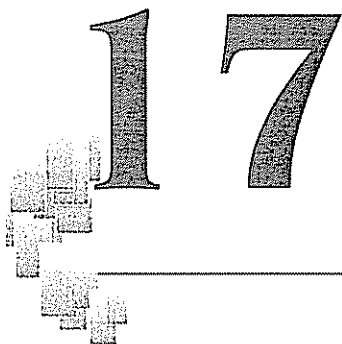
Problemas

1. Um paciente com retinoblastoma tem um único tumor em um olho. O outro olho está livre de tumores. Que etapas você tentaria para determinar se é um retinoblastoma esporádico ou hereditário? Que consulta genética você daria? Que informação os pais devem receber antes de uma gestação subseqüente?

2. Discuta os possíveis motivos pelos quais o câncer colorretal é um câncer adulto, enquanto o retinoblastoma afeta crianças.

3. Muitos tipos de tumor são caracterizados pela presença de um isocromossomo do braço longo do cromossomo 17. Cite uma possível explicação para este achado

4. Muitas crianças com anemia de Fanconi têm defeitos nos membros. Se uma criança afetada precisa de uma cirurgia em um membro anormal, que considerações especiais surgem?

5. Wanda, cuja irmã tem câncer de mama bilateral pré-menopausa, tem um risco maior de desenvolver câncer de mama (de 30% a 50%) que Wilma, cuja irmã tem câncer de mama pré-menopausa em apenas uma mama (de 10% a 15%). Tanto Wanda quanto Wilma, entretanto, têm um risco maior que Winnie, que tem uma história familiar totalmente negativa (cerca de 5% a 10%). Considerando a informação deste capítulo e do Cap. 15, forneça uma explicação para estes riscos empíricos

Aspectos Genéticos do Desenvolvimento

Há uma complexa relação entre a genética e o desenvolvimento embrionário que tem implicações fundamentais e práticas para a saúde humana e a doença. Anomalias congênitas tais como fenda palatina, aganglionose intestinal e malformação cardiovascular ocorrem em aproximadamente 1 a cada 200 natitivos e são responsáveis por cerca de 25% das mortes em uma unidade de tratamento intensivo neonatal. A compreensão dos programas genéticos que orientam o desenvolvimento normal é um pré-requisito para entender e planejar tratamentos para os defeitos humanos de nascimento. A interface entre a biologia do desenvolvimento e a genética também é o campo de teste para as tecnologias baseadas em células-tronco, engenharia dos tecidos e clonagem celular, que são promissoras para o tratamento de doenças de início na vida adulta, tais como a doença de Parkinson, a leucemia e os danos na coluna vertebral. Finalmente, os princípios que orientam o desenvolvimento normal são aqueles nos quais as técnicas modernas de diagnóstico pré-natal estão baseadas.

Neste capítulo, primeiro faremos uma revisão dos princípios gerais da genética do desenvolvimento usando como exemplos várias síndromes malformativas humanas importantes. Discutiremos então como estes princípios são aplicados pelos clínicos no cuidado dos pacientes e de suas famílias afetadas por, ou em risco de, graves defeitos de nascimento. Finalmente, discutiremos como os recentes avanços na embriologia experimental oferecem novas oportunidades e novos desafios para o tratamento das doenças humanas.

INTRODUÇÃO À BIOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO

Começamos descrevendo as origens e os conceitos da biologia do desenvolvimento e a relevância dos mecanismos do desenvolvimento para a doença humana.

O Que É a Biologia do Desenvolvimento?

A biologia do desenvolvimento refere-se aos processos genéticos, bioquímicos, celulares e fisiológicos pelos quais um embrião de uma célula origina um organismo inteiro. O campo teve suas origens quando os embriões puderam ser observados pela primeira vez usando-se o microscópio, mas o século XX viu a transformação da embriologia, uma ciência descritiva, em biologia do desenvolvimento, uma ciência integrativa baseada na manipulação experimental. Esta transformação inicialmente veio sob a forma de estudos feitos em embriões de organismos-modelo: marcação de células de modo que elas pudessem ser seguidas durante a embriogênese, explantes de tecidos embrionários em culturas de tecidos e transplantes de tecidos embrionários de uma região de um embrião para outra região. Tal manipulação microcirúrgica do embrião forneceu uma base para se observar o desenvolvimento embrionário em termos de processos e mecanismos-chave (Fig. 17.1 e Boxe). Mais recentemente, a biologia do desenvolvimento tornou-se uma ciência moderna pela introdução dos conceitos e das ferramentas da genética molecular. O estudo das mutações que causam anomalias de desenvolvimento e a capacidade de suprimir ou alterar a expressão de genes em organismos-modelo permitem que os biólogos do desenvolvimento identifiquem os genes importantes para o desenvolvimento normal e as vias que estes genes regulam.

Biologia do Desenvolvimento e Doenças Humanas

Os mecanismos do desenvolvimento normais e os modos pelos quais eles dão errado formam uma base conceitual para compreender muitos tipos diferentes de doenças humanas. O conhecimento destes mecanismos constitui a pedra angular dos cuidados de pacientes afetados e suas famílias. O espectro clínico das anomalias do desenvolvimento humano é extremamente amplo (Quadro 17.1). Embora a maioria das anomalias do desenvolvimento chame a atenção clínica ao nascimento ou dentro dos primeiros meses de vida, algumas, *situs inversus* ou uma valva aórtica bicúspide, por exemplo, podem não ser aparentes até a adolescência ou a vida adulta. Algumas anomalias do desenvolvimento são causadas por mutação em genes únicos, necessários a eventos morfogenéticos importantes, e, portanto, ocorrem em padrões de herança previstos pela herança mendeliana clássica (Quadro 17.1). Em outros casos, as anomalias são causadas por desequilíbrio cromossômico, como na trissomia do 21 (ver Cap. 10), e ocorrem esporadicamente. Por fim, como em muitos distúrbios genéticos comuns (ver Cap

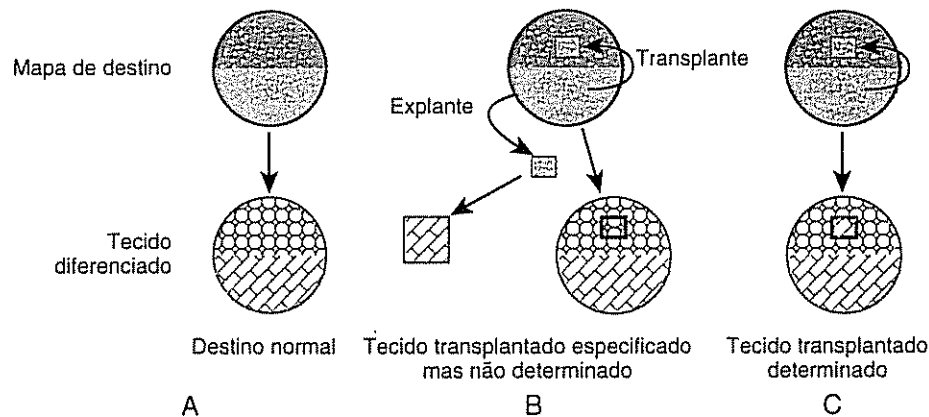



Fig. 17.1 Conceitos operacionais de embriologia experimental. Duas regiões embrionárias diagramáticas nas metades superior e inferior do embrião são representadas arbitrariamente como cinza e vermelho, respectivamente. No embrião real, as células podem ser distintas apenas por sua posição, mas, após a diferenciação, os dois tipos celulares dão origem a tecidos diferentes (como indicado pelo padrão, retangular *versus* circular). Assim, o mapa de destino pode ser traçado onde a parte superior do embrião dá origem a células circulares e a parte inferior origina células retangulares (A). Se as células marcadas da metade inferior (vermelho) são explantadas e mantêm seu destino original quando crescem autonomamente, diz-se que elas sofreram **especificação**. Se estas mesmas células, quando transplantadas para a metade superior, acompanham o destino da metade superior, então as células ainda não foram **determinadas** (B). Se as células são transplantadas e conservam seu destino original, diz-se que elas tinham sido determinadas antes do transplante (C).

15), as anomalias do desenvolvimento humano podem ser causadas por uma combinação de fatores genéticos, ambientais ou ambos e, portanto, ocorrem em padrões mais típicos de herança multifatorial. Mesmo quando o evento inicial de uma anomalia do desenvolvimento é totalmente ambiental, entretanto, tal como na síndrome de dilantina fetal ou na síndrome do álcool fetal, a seqüência fisiopatológica é mediada por alterações na expressão gênica. Assim, a compreensão dos programas morfogenéticos que orientam o desenvolvimento normal é um pré-requisito para compreender e planejar tratamentos para todas as anomalias do desenvolvimento, independente de sua causa primária.

GENES NO DESENVOLVIMENTO

A Importância dos Organismos-modelo para a Genética do Desenvolvimento Humano

Os organismos-modelo, tais como as moscas-das-frutas, os vermes e os peixes, foram usados por muitos anos para estudar o desenvolvimento. Um enfoque é fazer **triagens de mutagênese**, nas quais um grande número de animais é exposto a um mutágeno e então cruzado, e sua prole é estudada quanto às anomalias no desenvolvimento embrionário. O mapeamento genético ou físico (ver Cap. 8) de animais que exibiam desenvolvimento anormal permitiu que os pesquisadores identificassem e isolassem vários genes necessários à embriogênese normal. Tais triagens indicaram que uma grande proporção de genes em todos os animais multicelulares desempenhavam funções diretamente relacionadas aos programas morfogenéticos. O que é importante para os geneticistas humanos, entretanto, é que muitos destes genes, se não a maioria, exibem uma curiosa conservação evolutiva. Na mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* em particular, os estudos da genética do desenvolvimento revelaram vários genes controladores do desenvolvimento conservados e usados ao longo do reino animal para estabelecer o plano corpóreo durante a embriogênese. Absolutamente todos estes genes controladores do desenvolvimento são usados durante o desenvolvimento humano e, quando mutados, originam anomalias reconhecidas como defeitos humanos de nascimento (Quadro 17.2).

Exemplo: O Gene PAX6 É um Regulador Conservado do Desenvolvimento do Olho

Um exemplo destes princípios destacados é evidente a partir dos humanos com mutações no gene *PAX6*, nos quais os primeiros estudos baseados na embriologia experimental mais tarde foram cruzados com aqueles baseados na genética do desenvolvimento feitos nas moscas-das-frutas e nos seres humanos.

O cristalino dos vertebrados desenvolve-se a partir de uma área especializada da superfície da ectoderme que se torna espessada em um **placódio** (o placódio óptico) e reveste um crescimento da neuroectoderme conhecido como **cúpula óptica** (Fig. 17.2). Os sinais da cúpula óptica **induzem** as células de revestimento do placódio a iniciarem um programa de expressão gênica que leva ao desenvolvimento e à diferenciação do cristalino. Entretanto, a identidade dos genes que iniciam este hipotético programa morfogenético do desenvolvimento do olho não estava clara até que se descobriu que os humanos (e os camundongos) com uma forma genética de desenvolvimento anormal do olho tinham mutações em um gene chamado *PAX6*. O gene *PAX6* codifica um fator de transcrição que contém dois tipos de domínios de ligação do DNA (um **domínio pareado** e um **homeodomínio**, ver mais adiante) e pode iniciar toda uma gama de mudanças no gene e na expressão da proteína (ver mais adiante). Os heterozigotos humanos para as mutações de perda de função de *PAX6* têm várias anomalias oculares, incluindo **aniridia**, ou ausência de íris. Os raros homozigotos têm ausência completa das estruturas da íris. O reconhecimento de que as mutações em *PAX6* causam aniridia ou anoftalmia levaram a experimentos subseqüentes que provaram que *PAX6* normalmente inicia e orquestra programas de desenvolvimento do olho em ambas as cúpulas ópticas e pla-

Conceitos da Biologia Moderna do Desenvolvimento

1. A **morfogênese** refere-se ao processo pelo qual as mudanças na forma da célula, na adesão celular, no movimento celular, na proliferação celular e/ou na morte celular dão origem a uma *estrutura* tridimensional. Em contraste, a **diferenciação** refere-se ao processo pelo qual uma ou mais células adquirem um padrão específico de expressão gênica e proteica característico de um determinado *tipo celular ou tecido*.
2. Quando uma região específica de um embrião regularmente origina a mesma estrutura — ou estruturas — no contexto do desenvolvimento normal, diz-se que a região tem um **destino** específico. Um compêndio de como todas as diferentes regiões de um embrião se desenvolvem é descrito como um **mapa de destino**, e o processo pelo qual uma célula atinge seu destino é chamado de seu **programa** de desenvolvimento. Por exemplo, as células externas de um blastocisto humano regularmente originam tecido da placenta e estruturas correlatas, enquanto as células internas regularmente originam o próprio embrião (ver texto principal)
3. Se uma região do embrião pode originar múltiplas estruturas quando exposta a ambientes diferentes, a região é chamada de **pluripotente**.
4. Durante o curso do desenvolvimento normal, determinadas regiões embrionárias tornam-se **comprometidas** com seu destino em um processo de dois estágios de **especificação** seguido de **determinação**. Inicialmente, o comprometimento é lábil. No início do comprometimento, se uma região do embrião for removida e cultivada *in vitro*, livre das influências dos tecidos embrionários vizinhos (*explantada*), ela em geral se desenvolverá nos mesmos tecidos que originaria se não tivesse sido explantada. Entretanto, se a mesma região for *transplantada*, isto é, movida para outro local do embrião, ela poderá tomar um destino diferente. Este fenômeno é chamado de especificação. Após a fase inicial de especificação, entretanto, o comprometimento torna-se irreversível e o destino celular não pode mais ser influenciado por ambientes embrionários diferentes. Este fenômeno é chamado de determinação. A compreensão e a manipulação dos mecanismos que controlam os comprometimentos do desenvolvimento são o foco das tentativas de desenvolver substituições transplantáveis para uma variedade de tecidos humanos.
5. Uma **linhagem** refere-se à prole de uma determinada célula que foi experimentalmente marcada. A prole de uma célula que pode ser facilmente identificada mais tarde no desenvolvimento — por exemplo, porque continua fisicamente adjacente — é chamada de um **clone**. A migração, o destino celular ou ambos podem depender da linhagem celular. Por exemplo, a prole das células somíticas e da crista neural originam uma distribuição segmentar de dermatomiótomos e melanócitos, respectivamente. Em outros casos, o destino celular depende não da linhagem, mas do ambiente. Por exemplo, as precursoras da retina neural originam tipos diferentes de neurônios retinais, dependendo da identidade das células vizinhas Estes diferentes padrões de desenvolvimento às vezes são descritos como "desenvolvimento dependente de **linhagem *versus* posição**". Um conjunto correlato de conceitos é a **autonomia celular** ou a **não-autonomia celular**, termos usados para dizer se o destino de uma determinada célula depende de genes expressos dentro desta célula ou de sinais de outras células
6. A **indução embrionária** é o processo pelo qual o destino de uma região embrionária depende de receber um sinal extracelular de uma segunda região, em geral adjacente. Por definição, a primeira região não deve ter sido totalmente determinada e, portanto, deve ser **competente** para responder ao **sinal indutivo** dado pela segunda região.
7. O **desenvolvimento regulador** descreve o processo pelo qual a remoção ou a destruição de uma região do embrião destinada a assumir um determinado destino é compensada por outras regiões embrionárias. Em contraste, o **desenvolvimento em mosaico** descreve um processo pelo qual diferentes regiões do embrião desenvolvem-se independentemente das regiões vizinhas A transição do desenvolvimento regulador para em mosaico ajuda a explicar o padrão de defeitos de nascimento causados por agentes ambientais ou farmacêuticos (ver texto principal).

códio do cristalino, provando, assim, uma importante ligação entre a embriologia experimental e a genética.

Um dos aspectos mais importanes do papel de *PAX6* no desenvolvimento ocular dos mamíferos é que o gene foi denominado em virtude de sua similaridade de seqüência e conservação evolutiva com o gene *paired* na mosca-das-frutas *Drosophila*. Descrito pelo modo no qual as mutações afetam pares de segmentos embrionários, *paired* é uma das muitas mutações letais embrionárias em *Drosophila* (ver Quadro 17.2) que controlam programas de desenvolvimento. Incluindo *PAX6*, há um total de nove genes humanos relacionados ao gene *paired* da mosca, e as evidências atuais sugerem que cada um deles controla aspectos específicos do desenvolvimento embrionário humano. Em uma marcante nota de rodapé, mostrou-se que existem genes adicionais de *Drosophila* similares ao *paired*, e um deles, o mais similar ao gene *PAX6*, é chamado de *eyeless* (Ey) porque as moscas mutantes não têm olhos. A expressão ectópica do gene Ey faz com que os olhos se desenvolvam em locais tais como pernas ou antenas. *Assim, muito embora muitos aspectos da estrutura dos olhos e do desenvolvimento difiram muito entre insetos e humanos, genes muito similares iniciam o programa de desenvolvimento para o mesmo órgão em animais separados por 500 milhões de anos de evolução.*

DESENVOLVIMENTO INICIAL: DA FERTILIZAÇÃO ATÉ A GASTRULAÇÃO

Um dos aspectos mais bem compreendidos do desenvolvimento humano é a fase que ocorre entre a fertilização e a implantação

QUADRO 17-1

Exemplos de Anomalias de Desenvolvimento Humano de Acordo com a Causa Primária

Condição	Achados Clínicos	Genética e Patogenia
	Gene Único	
Aniridia	Íris reduzida ou ausente, freqüentes anomalias na retina, no cristalino e/ou na córnea	Mutações autossômicas semidominantes de perda de função no fator de transcrição *PAX6*; também observada junto com o tumor de Wilms e nas anomalias geniturinárias como parte da deleção 11p13 da síndrome WAGR (tumor de Wilms, aniridia, genitália ambígua)
Síndrome de Rubenstein-Taybi	Retardo mental, polegares e artelhos largos, fendas palpebrais inclinadas para baixo, maxilar hipoplásico, nariz proeminente, doença cardíaca congênita	Heterozigose para mutações de perda de função no gene autossômico que codifica a proteína de ligação a CREB (CBP), um coativador transcricional de muitos genes-alvo diferentes
Síndrome de Waardenburg	Surdez, mecha branca nos cabelos, pigmentação dos olhos clara e/ou assimétrica Os casos devidos às mutações *PAX3* têm um espaçamento anormalmente maior entre os olhos e ocasionais defeitos de membros superiores	Mutações autossômicas semidominantes de perda de função em um dentre dois genes diferentes: *PAX3*, que codifica um fator de transcrição expresso no tubo neural e somitos, ou *MITF*, que codifica um fator de transcrição bHLH expresso nas células pigmentares em desenvolvimento
Simpolidactilia	Abas interfalangeais e dedos extras nas mãos e nos pés	Mutação semidominante de ganho de função em *HOXD13*
Holoprosencefalia	A morfogênese defeituosa e a clivagem bilateral do prosencéfalo e da face média causa manifestações que variam de leves (único incisivo central) a graves (microcefalia, ciclopia)	Aproximadamente 10% dos casos são causados por heterozigose de mutações de perda de função em *SHH*, que codifica uma molécula de sinalização parácrina sensível à dose; outras etiologias incluem loci monogênicos, causas multifatoriais e síndromes de desequilíbrio cromossômico
Síndrome de Cornelia de Lange	Retardo mental e de crescimento, deficiências dos membros superiores, sinofre, ponte nasal baixa, nostrilos antevertidos, lábio superior fino	Provavelmente nova mutação dominante, em geral esporádica, de gene desconhecido; rara recorrência em irmãos pode ser mosaicismo de linhagem germinativa
	Multifatorial e/ou Teratogênica	
Fenda labial com ou sem palato fendido	Ausência de tecido da linha média do lábio superior, pode se estender posteriormente para envolver o palato mole e rígido	Ocorrências isoladas, em geral poligênicas e associadas a riscos de recorrência de 3% a 5%; com menos freqüência, associadas a achados que sugerem causa sindrômica (Cap 15)
Síndrome do álcool fetal	Microcefalia, hipoplasia do nervo óptico, retardo de desenvolvimento, anomalias faciais, comportamento hiperativo	A exposição pré-natal ao etanol durante períodos cruciais do desenvolvimento cerebral causa morte dos neurônios em desenvolvimento
Embriopatia de ácido retinóico	Microtia (orelhas pequenas), malformações cardíacas conotroncais, malformações de fossa posterior, anomalias do timo e da paratireóide	A exposição à isotretinoína causa anomalias das estruturas derivadas da crista neural e do arco branquial
	Desequilíbrio Cromossômico	
Trissomia do 21	Retardo mental e de crescimento, características faciais anormais, hipotonia, defeito de coxin endocárdico, atresia duodenal	50% de aumento na dosagem de 250 genes no cromossomo 21
Síndrome velocardiofacial	Palato fendido, nariz proeminente em forma de pêra, malformações cardíacas conotroncais, distúrbios de aprendizagem	Microdeleção heterozigota em 22q11 que contém 20 genes; genes individuais responsáveis por anomalias morfogenéticas ainda não-identificados

QUADRO 17-2

Homólogos de Genes de Controle do Desenvolvimento de *Drosophila* como Causas de Anomalias Humanas

Condição	Gene	Achados Clínicos
Síndrome de carcinoma nevóide de célula basal	Gene *patched* de *Drosophila* necessário à segmentação embrionária; o gene *PTC* humano é 29% similar	Crescimento excessivo, anomalias esqueléticas, aumento de suscetibilidade ao carcinoma de célula basal e ao meduloblastoma
Síndrome de Greig; síndrome de Pallister-Hall; polidactilia pós-axial	Gene *cubitus interruptus* de *Drosophila* necessário à segmentação embrionária; o gene humano *GLI3* é 22% idêntico	Dedos extras (polidactilia), fusão de estruturas ósseas no crânio (craniossinostose), tumores hipotalâmicos (na síndrome de Pallister-Hall)
Holoprosencefalia (HPE3)	Gene *hedgehog* de *Drosophila* necessário para segmentação; o gene humano *SHH* é 38% idêntico	Desenvolvimento reduzido ou ausente do prosencéfalo e das estruturas da face média
Síndrome de Saethre-Chotzen	Gene *twist* de *Drosophila* necessário para o desenvolvimento do mesoderma; o gene *TWIST* humano é 32% similar	Craniossinostose e características faciais anormais
Síndrome de Townes-Brock	Gene *spalt* de *Drosophila* necessário para a especificação das regiões da cabeça e da cauda; o gene humano *SALL1* é 21% idêntico	Deficiência de membro, anomalias no ouvido, atresia ou estenose anal

uterina. Os primeiros estudos do desenvolvimento pré-implantação foram feitos inicialmente em camundongos, pois pode-se remover um embrião pré-implantado do trato reprodutivo, marcar as células específicas e, então, devolvê-lo à tuba falopiana ou ao útero e deixar que se desenvolva normalmente. Tais estudos nos ajudaram não só a compreender o desenvolvimento humano normal, mas também a desenvolver enfoques e métodos tais como a fertilização *in vitro* e o diagnóstico pré-implantação para tratamento de uma variedade de anomalias na reprodução humana (ver mais adiante).

Um princípio geral da embriogênese dos mamíferos é que as primeiras células que se diferenciam são aquelas que originam os tecidos extra-embrionários necessários para a implantação e a formação da placenta (Fig. 17.3). Antes da implantação, os tecidos embrionários definitivos ainda não se formaram, e o zigoto dos mamíferos às vezes é chamado de concepto ou pré-embrião. O embrião definitivo surge de um pequeno grupo de células dentro do blastocisto. Esta região é descrita inicialmente como a **massa celular interna** (ICM) e mais tarde como o **ectoderma primitivo** ou **epiblasto** (quando as camadas celulares internas se formam dentro do blastocisto e aparece a cavidade amniótica). Um dos primeiros tecidos formados pelo embrião definitivo é o de células germinativas, que mais tarde dão origem aos ovócitos e espermatócitos.

O Desenvolvimento Mamário Inicial é Principalmente Regulador

No blastocisto dos mamíferos, partes substanciais de uma determinada região podem ser removidas, e o concepto é capaz de se

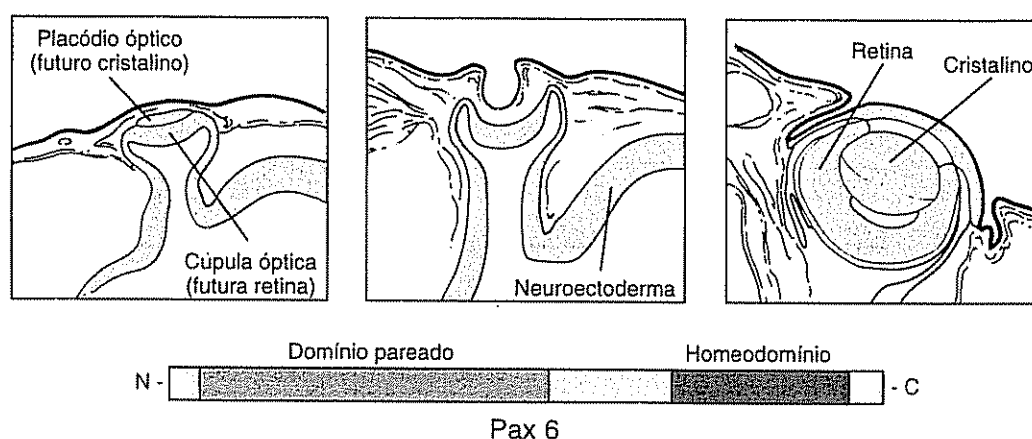



Fig. 17.2 Indução embrionária e expressão de *PAX6* durante o desenvolvimento do olho no camundongo. A proximidade à cápsula óptica recém-formada faz com que as células ectodérmicas revestidoras tornem-se espessadas no placódio óptico, que mais tarde se diferencia no cristalino. *PAX6* é expresso em altos níveis no placódio óptico nascente e é necessário para a formação do placódio. *PAX6* também é expresso em níveis baixos na cápsula óptica e no cristalino, na retina e na íris em diferenciação. A heterozigose para uma mutação de perda de função em *PAX6* causa várias anomalias, incluindo hipoplasia ou aplasia da íris (aniridia). A homozigose causa a ausência do placódio óptico e anomalias do sistema nervoso central. (Reimpressa com permissão de Grindley J C , Davidson D R , Hill R E (1995) The role of Pax-6 in eye and nasal development. Development 121:1433-1442. Copyright 1995. The Company of Biologists Limited.)

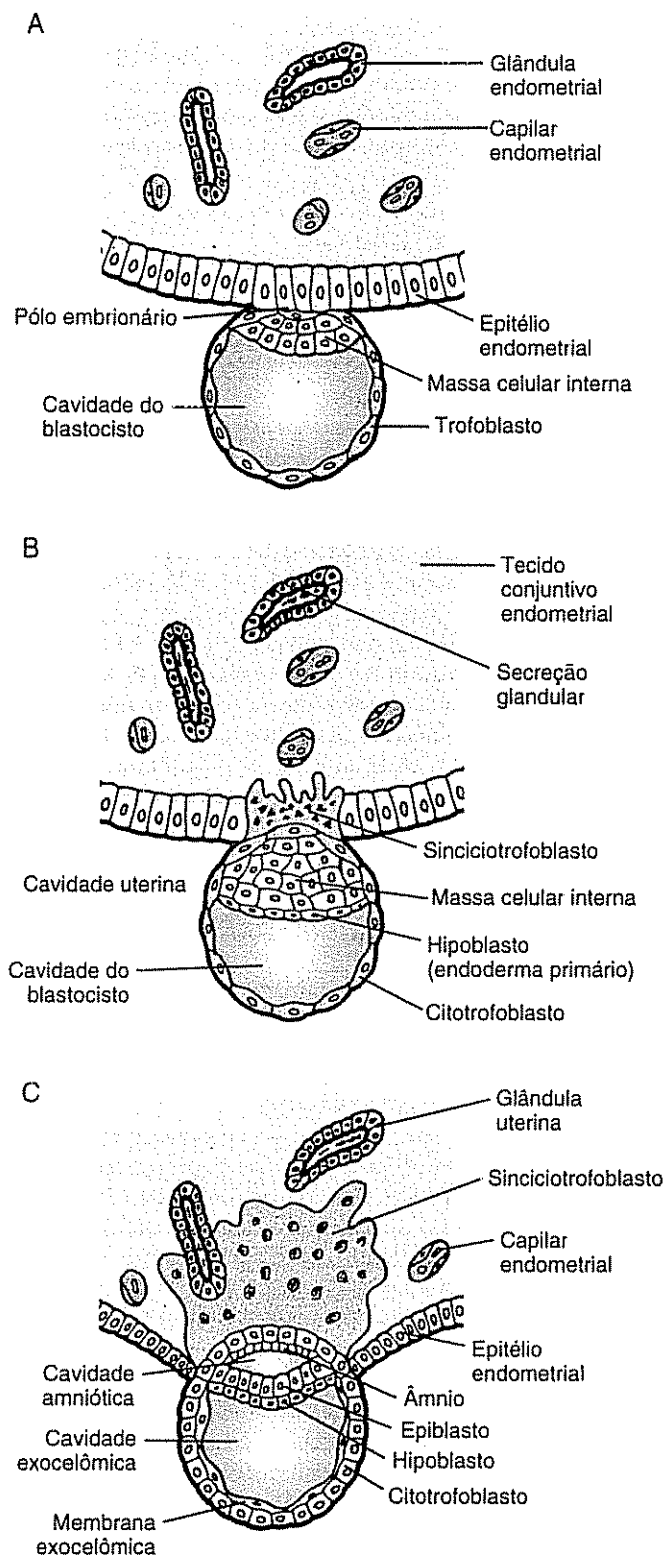



Fig. 17.3 Linhagem celular e o destino durante o desenvolvimento pré-implantação. A idade embrionária é dada em tempo após a fertilização em humanos: *A*, 6 dias; *B*, 7 dias; *C*, 8 dias após a fertilização. (Reimpresso com permissão de Moore K L, Persaud T V N. [1998] The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 6.ª ed, WB Saunders, Philadelphia.)

desenvolver normalmente. Por exemplo, a divisão de um blastocisto inicial em duas partes iguais origina gêmeos monozigóticos de tamanho normal (ver adiante). Uma segunda ilustração é o fato de que um embrião normal pode ser formado a partir de uma única célula da ICM. Esta capacidade de compensar regiões que são danificadas ou removidas é descrita como **desenvolvimento regulador** e tem conseqüências importantes para a reprodução humana. Em tecidos sujeitos ao desenvolvimento regulador, as células podem ser removidas ou danificadas sem prejuízo. Por exemplo, o diagnóstico pré-natal feito via biópsia de um embrião pré-implantação é possibilitado pelo desenvolvimento regulador da ICM. Além disso, a exposição a teratógenos potenciais nas 2 semanas seguintes à concepção tem um risco muito baixo de causar defeitos de nascimento, em parte porque os tecidos do embrião inicial são capazes de regular o desenvolvimento.

O **desenvolvimento em mosaico** fica no extremo oposto da gama do desenvolvimento regulador e refere-se a uma situação na qual o destino de uma determinada célula é especificado independentemente de seu ambiente. Neste caso, se partes de um tecido em desenvolvimento forem removidas ou destruídas, o que resta continuará a se desenvolver como o faria, sem compensar as células ausentes. Nos embriões dos mamíferos, o desenvolvimento em mosaico em geral ocorre nos órgãos em desenvolvimento para uma fase curta antes da diferenciação manifesta. O desenvolvimento em mosaico ou, mais apropriadamente, a ausência do desenvolvimento regulador é subjacente aos efeitos prejudiciais de agentes teratogênicos que atuam fazendo com que as células suscetíveis morram, como na perda das células no cristalino fetal durante a exposição ao vírus da rubéola, levando à catarata congênita e à microftalmia.

Gastrulação e Anomalias do Desenvolvimento

Logo após o concepto do mamífero se ligar ao revestimento do útero e começar a implantação, cerca de 6 dias após a concepção, as células que irão originar o embrião ficam em um único tecido, o ectoderma primitivo ou epiblasto. As três camadas germinativas primárias, **ectoderma** definitivo, **endoderma** definitivo e **mesoderma**, surgem do epiblasto por um processo conhecido como gastrulação, uma série altamente orquestrada de sinais e movimentos celulares. (Uma descrição completa da gastrulação está além do escopo deste texto). Os primórdios para vários sistemas principais de órgãos tornam-se aparentes após a gastrulação, incluindo o coração, o cérebro e a coluna vertebral, o sistema esquelético e o trato gastrintestinal. A gastrulação não é apenas o ponto inicial da organogênese, mas também marca o começo de um período no qual o embrião não pode mais compensar com facilidade grupos de células danificadas ou perdidas. Em outras palavras, o desenvolvimento regulador não é mais operativo. *Por estes motivos, e porque vários primórdios de órgãos são alocados de grupos relativamente pequenos de células, o período de organogênese após a gastrulação é um período no qual há mais probabilidade de que os defeitos de desenvolvimento ocorram.*

EXPRESSÃO GÊNICA DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Como em todos os outros aspectos do funcionamento celular, é o conjunto de genes expressos dentro de uma célula que finalmente controla a função da célula. No desenvolvimento, entretanto, há um nível adicional (e essencial) de complexidade. As diferentes células de um embrião expressam grupos diferentes

de genes em épocas diferentes Primeiro consideraremos a questão mais geral de como o genoma controla a expressão gênica e, então, discutiremos como os programas de expressão gênica em células diferentes interagem para efetuar a morfogênese e os programas de diferenciação.

Diferenciação Celular, o Genoma e a Expressão Gênica

Para compreender como uma única seqüência genômica codifica instruções para vários tipos celulares diferentes, é essencial conhecer como os padrões de expressão gênica tornam-se alterados durante a diferenciação celular. As diferenças entre um neurônio, um queratinócito e um osteoblasto são, em grande parte, o resultado da expressão diferencial de um pequeno número de "genes *master*", genes reguladores do desenvolvimento que também são necessários para manter o estado diferenciado. Em contraste, a maioria dos genes expressos em uma célula também é amplamente expressa em outros tipos de células. Este grupo comum de genes é necessário para funções metabólicas celulares básicas, tais como a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, o transporte e uso de nutrientes e a biogênese do citoesqueleto e das organelas. Na maior parte, estes genes de **manutenção** são expressos ubiquamente e podem somar cerca de 80% a 90% dos genes expressos em um determinado tipo de célula. O restante dos genes expressos varia. Eles são genes **especializados** que definem as características únicas dos diferentes tipos de células (ver Cap. 12).

A regulação da expressão gênica é um aspecto essencial da biologia do desenvolvimento. Como descrito no Cap. 3, esta regulação é mediada por uma classe de proteínas, os fatores de transcrição, que se ligam a elementos reguladores adjacentes às seqüências transcritas. Estes elementos reguladores são componentes essenciais de cada gene e são tão cruciais para o funcionamento normal de um gene quanto o são as seqüências codificantes (Fig. 17.4). As seqüências reguladoras imediatamente adjacentes ao ponto de início que são necessárias para os aspectos gerais da transcrição em geral são descritas como elementos **promotores**. Os elementos promotores contrastam com os elementos **silenciadores** ou os **acentuadores**, que bloqueiam ou estimulam a transcrição histoespecífica e podem estar a alguma distância do ponto de início. Os elementos silenciadores e acentuadores ligam-se a fatores especializados de transcrição que ajudam a inibir ou a ativar, respectivamente, os padrões de expressão gênica que definem tipos particulares de células.

Exemplo: Mutações em um Coativador Transcricional Causam a Síndrome de Rubenstein-Taybi

As ações de fatores de transcrição gerais e histoespecíficos interagem para permitir o início da síntese de mRNA. Os mecanismos bioquímicos pelos quais isto ocorre e a importância da regulação transcricional do desenvolvimento são salientados por correlações genótipo-fenótipo para uma molécula chamada CBP, ou proteína de ligação CREB. A CBP serve como uma ponte molecular, ou coativador, entre vários tipos diferentes de fatores de transcrição histoespecíficos e a chamada maquinaria geral de transcrição (Fig. 17.4A). As mutações de perda de função em CBP causam uma condição dominante, a **síndrome de Rubenstein-Taybi**, na qual o retardo mental com polegares e artelhos largos é acompanhado de hirsutismo, criptorquidismo, defeitos cardíacos congênitos, feições características com fendas palpebrais inclinadas para baixo, maxilar hipoplásico e nariz proeminente (Fig. 17.4B). A natureza ampla ou **pleiotrópica** das anomalias vistas nos pacientes com síndrome de Rubenstein-Taybi ilustram a diversidade de tipos celulares que usam uma via molecular comum para a regulação da transcrição.

Estabilidade do Fenótipo Diferenciado e Linhagem Celular

Uma vez ativada, a manutenção do fenótipo diferenciado em geral é estável durante as divisões celulares subseqüentes, estabelecendo, assim, uma **linhagem celular**. Por exemplo, os fibroblastos de pele e os queratinócitos de uma única pessoa expressam altos níveis de colágeno e queratina, respectivamente, embora suas seqüências genômicas sejam idênticas. Quando estes tipos celulares são cultivados fora do corpo, não só são mantidos os padrões característicos da expressão gênica, como tais culturas podem ser usadas para fornecer enxertos de pele. A transmissão estável dos padrões de expressão gênica para as células filhas, na ausência de qualquer mudança no conteúdo ou na seqüência de DNA, é uma forma de regulação **epigenética**, na qual as mudanças no fenótipo são transmitidas sem uma mudança no genótipo. No nível molecular, a manutenção do fenótipo diferenciado é a conseqüência de uma alteração na estrutura da cromatina ou uma modificação do DNA, ou ambas (ver Caps. 3 e 10). Tais alterações não afetam a seqüência de DNA em si, mas são preservadas durante a mitose, de modo que os padrões estáveis de expressão gênica são mantidos e uma linhagem celular é perpetuada.

Células-tronco e Regeneração

Para alguns tipos de células, a aquisição de um fenótipo diferenciado normal está associada à perda da capacidade proliferativa. Os neurônios, os eritrócitos e as plaquetas, por exemplo, são células altamente diferenciadas, que desempenham funções essenciais, mas que não se dividem. A substituição de eritrócitos e das plaquetas ocorre em uma base regular, entretanto, e depende de **células-tronco**. Células indiferenciadas que são capazes de ampla proliferação, as células-tronco podem originar células-tronco adicionais (auto-renováveis) ou células progenitoras comprometidas com a formação de derivadas diferenciadas (Fig. 17.5). A maioria das células-tronco é dita **pluripotente**, o que significa que dão origem a vários tipos diferentes de células após subseqüentes ciclos de divisão. Todo o programa de desenvolvimento das células sanguíneas é baseado em uma linhagem que usa células-tronco e precursores pluripotentes (Fig. 17.5). Além de sua relevância para a patogenia de doenças genéticas, os programas que criam e mantêm as células-tronco hematopoéticas forneceram a base para o uso do transplante de medula no tratamento de doenças tais como a anemia aplástica, a leucemia e o linfoma (ver Cap. 13).

Ao contrário dos eritrócitos e das plaquetas, algumas células diferenciadas que não têm capacidade proliferativa, tais como os neurônios e as células secretoras endócrinas, podem viver por décadas sem serem substituídas. Os estudos feitos durante os últimos anos, entretanto, têm demonstrado que as células-tronco para neurônios e outros tecidos diferenciados estão presentes não só durante o desenvolvimento, mas em alguns casos perma-

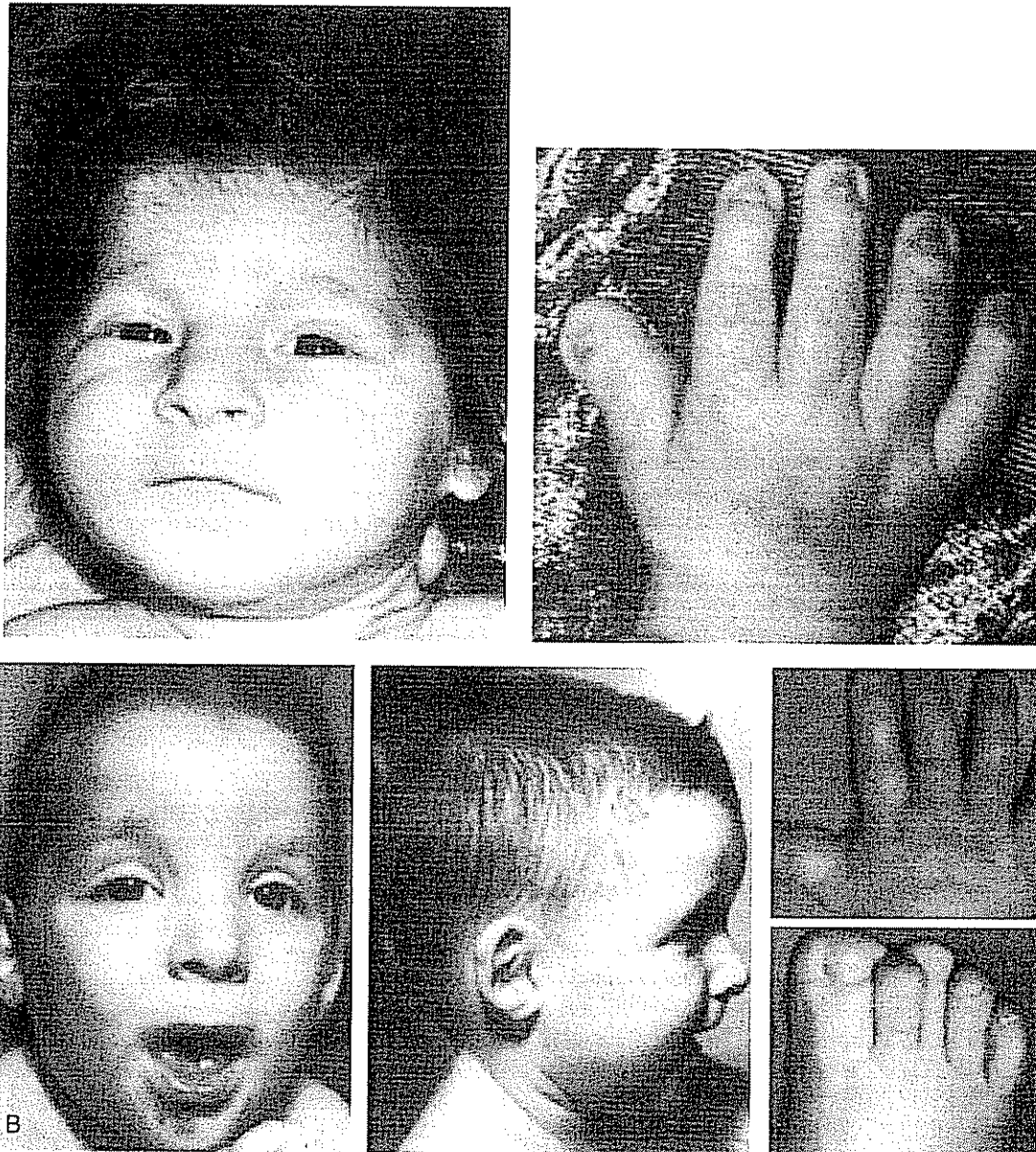
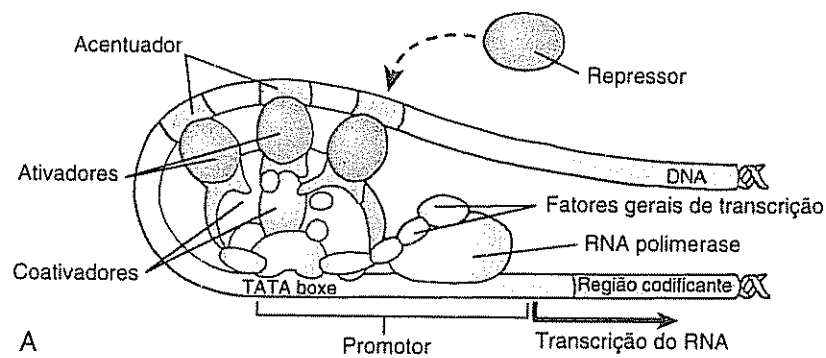



Fig. 17.4 As mutações de um coativador transcricional causam anomalias pleiotrópicas. *A*, a RNA polimerase e os fatores gerais de transcrição, mostrados em rosa, ligam-se a seqüências de ativação cis adjacentes ao ponto de início de transcrição do mRNA. Estas seqüências de ação cis são coletivamente chamadas de promotor. Os elementos mais distais acentuador e/ou silenciador ligam-se a fatores de transcrição especializados e/ou histoespecíficos. As proteínas coativadoras, tais como CBP, facilitam uma interação bioquímica entre os fatores de transcrição especializados e gerais. (De Tijian R. [1995] Molecular machines that control genes. Sci Amer 272:54-61.) *B*, a heterozigose de uma mutação de perda de função CBP causa a síndrome de Rubenstein-Taybi, na qual as anomalias pleiotrópicas refletem os vários genes para os quais é necessária CBP para obter a regulação apropriada de transcrição. (Figura reimpressa com permissão de Jones K.L. [1998] Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. WB Saunders, Philadelphia.)

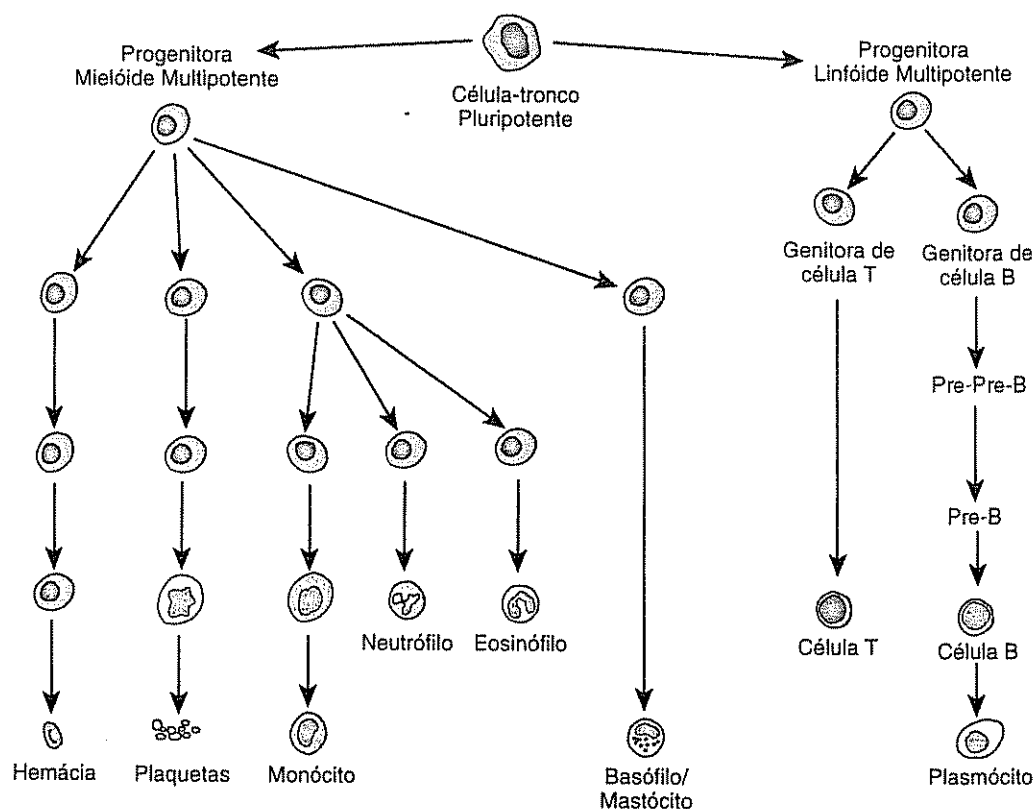



Fig. 17.5 Desenvolvimento de células hematopoéticas. (Figura reimpressa com permissão de Stamatoyannopoulos G. Nienhuis A W. Majerus P W. Varmus H (1987) The Molecular Basis of Blood Diseases. 2.ª ed WB Saunders. Philadelphia.)

necem nos tecidos adultos. Estas células-tronco geralmente podem ser transplantadas, como no caso do transplante de medula óssea, para se dividir e contribuir com derivadas diferenciadas de um modo similar às normais durante o desenvolvimento. A maioria dos estudos de células-tronco fetais tem sido feita em modelos animais, mas esta área de pesquisa oferece um tremendo potencial para o tratamento de uma variedade de doenças humanas, tais como a doença de Parkinson, a diabetes melito tipo 1 e a cirrose (ver mais adiante).

Hierarquias dos Programas de Desenvolvimento e Restrições Progressivas do Destino Celular

Os padrões de expressão gênica característicos de células altamente diferenciadas tais como os melanócitos, os fibroblastos e os queratinócitos são adquiridos relativamente tarde no desenvolvimento, após os eixos corpóreos e as principais camadas germinativas terem sido estabelecidos, bem como os rudimentos dos principais sistemas orgânicos. Entretanto, as precursoras destes tipos celulares desenvolvem-se em um padrão específico e orquestrado que em geral depende da linhagem celular. Por exemplo, os melanócitos desenvolvem-se a partir das cristas neurais, que também dão origem à medula adrenal, ao sistema nervoso autônomo, aos neurônios sensoriais e ao tecido conjuntivo da cabeça e da face. A crista neural em si é um produto do neuroectoderma, que também origina o cérebro, a hipófise posterior e a cúpula óptica. Assim, o destino celular durante o desenvolvimento é adquirido de um modo hierárquico, que depende da linhagem celular (ver Fig. 17.5). Quais são os mecanismos genéticos que contribuem para a especificação progressiva e a determinação do destino celular durante o desenvolvimento inicial? Embora uma resposta completa ainda não esteja disponível, um tema geral baseado nos estudos de organismos-modelo indica que fatores de transcrição específicos atuam em uma rede hierárquica e combinatória para especificar destinos celulares diferentes.

Exemplo: Síndrome de Waardenburg e Mutações de Fatores de Transcrição Histoespecíficos

A relação entre as hierarquias das linhagens celulares durante o desenvolvimento e as redes de fatores de transcrição histoespecíficos é exemplificada pela patogenia molecular da **síndrome de Waardenburg**, que, em alguns casos, resulta de mutações em um gene relacionado a *PAX6* (ver discussão anterior), chamado de *PAX3*. O *PAX3* é expresso no desenvolvimento da crista neural e também no componente dermamotomiotonal dos somitos, que são células derivadas do mesoderma que originam os músculos esqueléticos e a derme (Fig. 17.6A). A heterozigose para as mutações de perda de função *PAX3* causam a síndrome de Waardenburg tipo I, caracterizada por uma redução ou deficiência de derivados da crista neural, tais como os melanócitos nos cabelos, olhos e ouvido interno, o que leva a uma mecha branca, olhos claros e em geral assimetricamente coloridos e surdez sensório-neural (Fig. 17.6B). Além disso, os pacientes com mutações *PAX3* exibem um espaço anormalmente grande entre as partes internas dos olhos e, ocasionalmente, têm defeitos na extremidade dos membros superiores (uma condição conhecida como síndrome de Waardenburg tipo III). Em contraste, as anomalias dos pacientes com a síndrome de Waardenburg tipo II são

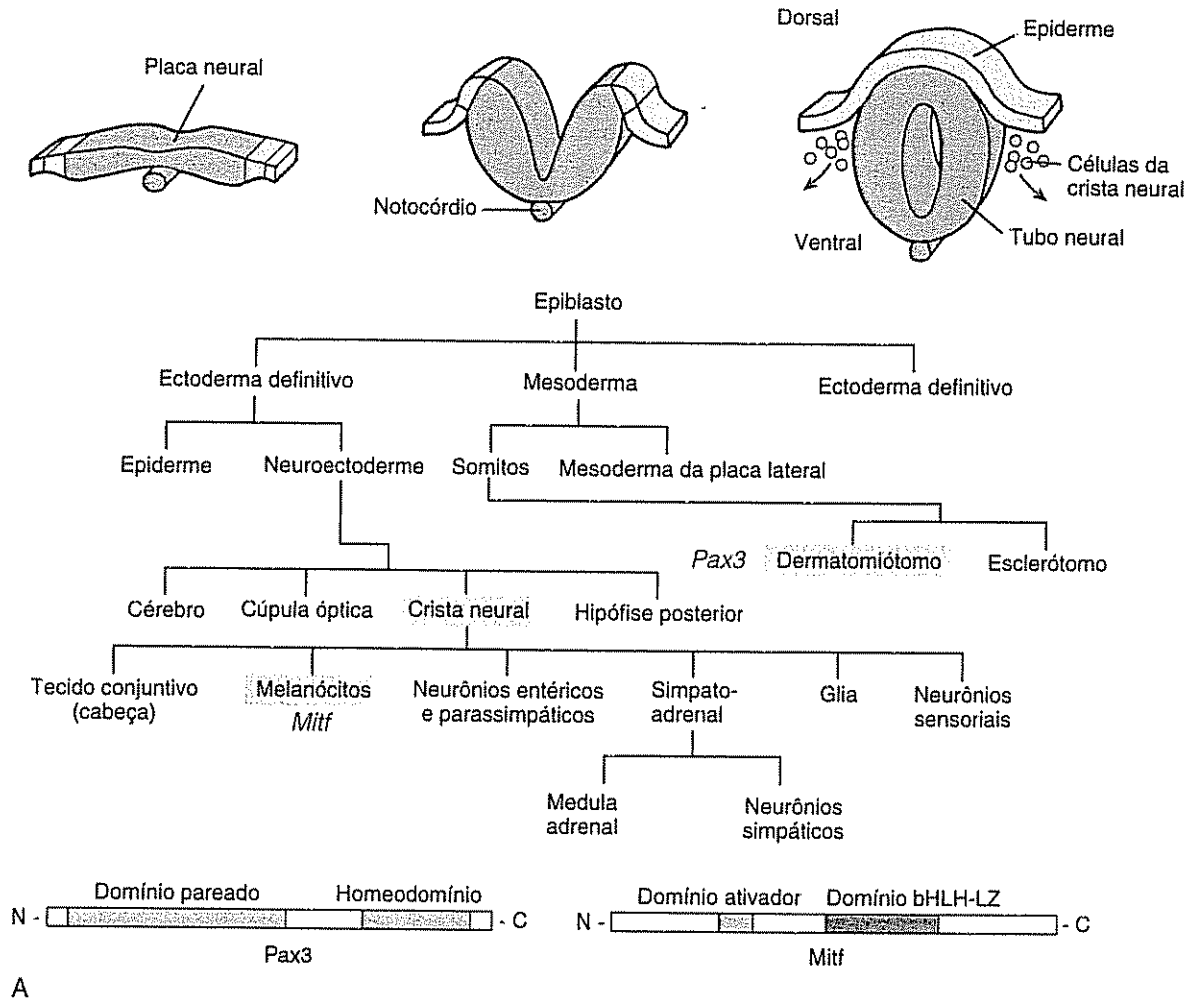



Fig. 17.6 A. Formação da crista neural e linhagem celular, bem como as posições de PAX6 e MITF na hierarquia das cristas neurais e do desenvolvimento de melanócitos A crista neural forma-se das margens do tubo neural à medida que ele se fecha abaixo da ectoderme O próprio tubo neural (neuroectoderma) é um derivado do ectoderma definitivo Os somitos são condensações segmentadas do mesoderma que ocorrem adjacentes ao tubo neural e originam os precursores do esqueleto (esclerótomo) e os precursores da derme e dos músculos (dermatomiótomo) (Figura reimpressa com permissão de Wolpert L., Beddington R., Brockes J *et al* [1998] Principles of Development Copyright 1998. Oxford University Press. Oxford. England) PAX3 e MITF codificam fatores de transcrição necessários ao desenvolvimento da crista neural. e dos melanócitos. como descrito no texto PAX3 é expresso no tubo neural, nas células da crista neural e no dermatomiótomo MITF é expresso no subgrupo de células da crista neural que originam os melanócitos

A ilustração continua na página seguinte

limitadas aos derivados de células pigmentares — mecha branca, mudanças de cor dos olhos e surdez — decorrentes de mutações em um gene diferente, chamado de *MITF*, de fator de transcrição associado à microftalmia (pois foi primeiro descoberto como a causa de uma mutação nos camundongos chamada de microftalmia). *MITF* codifica um fator de transcrição especializado que se liga e ativa genes-alvo necessários ao desenvolvimento das células pigmentadas. A expressão de *MITF* é limitada a células pigmentadas e seus precursores e é tida como dependente, em parte, da transativação por *PAX3*. Assim, as características clínicas da síndrome de Waardenburg causadas por anomalias dos melanócitos podem ser relacionadas a um fator de transcrição histoespecífico, *MITF*, no qual os defeitos são causados ou por mutações no próprio gene *MITF* ou em *PAX3*, um de seus reguladores antecedentes. Em contraste, as anomalias faciais ou das extremidades superiores vistas em adição às anomalias das células pigmentares nos pacientes com síndrome de Waardenburg tipos I e III refletem um papel de *PAX3* no tecido conjuntivo derivado da crista neural da face e da cabeça e no tecido dos membros superiores derivado dos somitos.

Migração Celular e Mistura Durante o Desenvolvimento

O extenso movimento celular exibido pelos derivados das cristas neurais é uma característica de vários tecidos, incluindo células germinativas e células hematopoéticas. Os mecanismos bioquímicos que facilitam a migração celular durante o desenvolvimento não são bem compreendidos, mas provavelmente envolvem mudanças programadas na adesão celular, bem como moléculas sinalizadoras difusíveis de curto e longo alcance (ver mais adiante).

No início da embriogênese, antes das camadas germinativas serem definitivamente formadas, ocorrem amplas misturas, e as células relacionadas por uma linhagem comum em geral são dispersas pelo embrião. Logo após começar a organogênese, entretanto, a mistura de células torna-se menos extensa, e em muitos

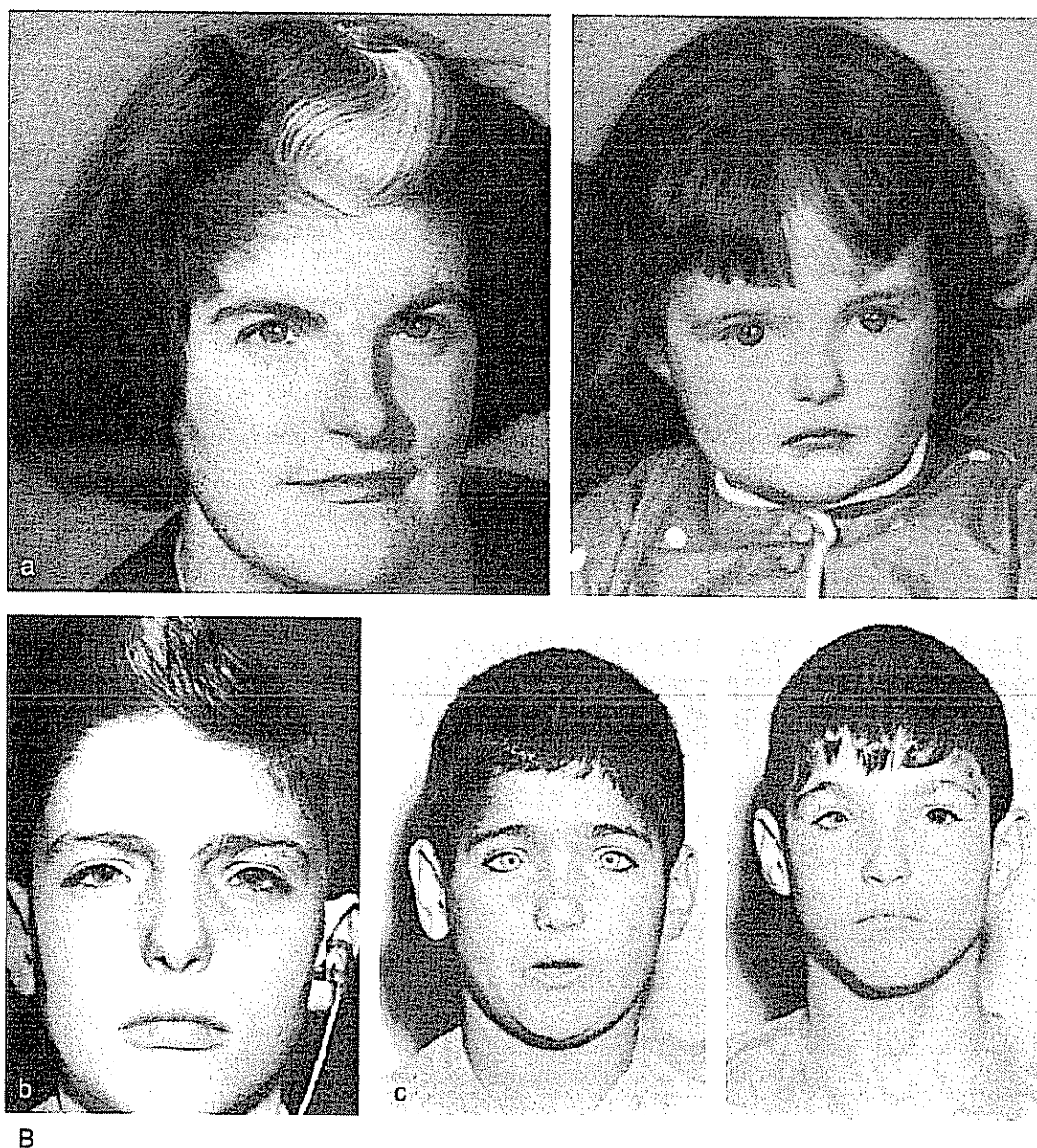



Fig. 17.6 *Continuação* B. Pacientes com a síndrome de Waardenburg tipo I a. Mãe e filha com mechas brancas (De Partington M W [1959] Arch Dis Child 34:1542) b. Aos 10 anos de idade com surdez congênita e mecha branca (De DiGeorge A M *et al* [1960] J Pediatric 57:649) c. Irmãos, um deles surdo Não há mecha branca, mas o menino da direita tem heterocromia da íris As mutações no gene *PAX3* causam a síndrome de Waardenburg tipo I (De Jones K L [1998] Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation WB Saunders, Philadelphia)

tecidos adultos as células relacionadas por linhagem permanecem adjacentes umas às outras. Isto pode criar um padrão mosaico composto de manchas ou **clones** de células que descenderam de um precursor comum. Como foi descrito no Cap 5, este padrão em geral é prontamente aparente nas mulheres heterozigotas para mutações ligadas ao X que causam mudanças no aspecto de uma célula, tais como o albinismo ocular ligado ao X ou a incontinência pigmentar.

Morfogênese: Programas Morfogenéticos de Autonomia Celular e sem Autonomia Celular

Existem dois modos fundamentalmente diferentes pelos quais as mutações podem afetar os processos morfogenéticos. Aqueles governados por mudanças intrínsecas na expressão gênica são descritos como de **autonomia celular**. Quando as mudanças induzidas por fatores extrínsecos afetam a morfogênese, o processo é descrito como **sem autonomia celular**. Por exemplo, a anoftalmia causada por mutações do fator de transcrição *PAX6* é de autonomia celular, pois as células que normalmente expressam *PAX6* falham em se desenvolver de modo apropriado (ver Fig. 17.2) Em contraste, uma causa comum de genitália ambígua em mulheres neonatas é um erro hereditário do metabolismo conhecido como deficiência de 21-hidroxilase, no qual a incapacidade de produzir cortisol, aldosterona ou ambos leva a uma hiperplasia adrenal congênita compensatória e a um aumento na produção de andrógenos adrenais (ver Cap. 10). A conseqüente masculinização da genitália externa feminina é uma mudança

morfogenética que não tem autonomia celular porque é causada por genes expressos na supra-renal e não nos próprios órgãos sexuais.

Genes HOX: Fatores de Transcrição Codificam a Identidade do Desenvolvimento

Como descrito antes para *MITF* (ver Fig. 17.6), os defeitos em fatores de transcrição histoespecíficos em geral causam anomalias de toda uma linhagem celular ou programa de expressão gênica. Os genes *HOX*, abreviação de "seletor homeótico", codificam uma classe especial de fatores de transcrição originalmente descobertos em *Drosophila*, nos quais são chamados de genes homeóticos (*HOM*) em função de sua capacidade de transformar uma parte do corpo em outra. Por exemplo, as mutações de um gene *HOM*, o gene *Antennepedia*, fazem com que cresçam pernas onde deveriam crescer antenas. Assim, os fatores de transcrição de *HOM* regulam um grande grupo de genes em seguida que são finalmente responsáveis pela morfogênese de partes diferentes do corpo. Quando foram identificados pela primeira vez, viu-se que os genes *HOM* de *Drosophila* compartilhavam um motivo proteico, chamado de **homeodomínio**, que se liga ao DNA. O homeodomínio foi descoberto em muitos outros fatores de transcrição, incluindo *PAX3* e *PAX6*. Entretanto, os genes humanos *HOX* são mais proximamente relacionados aos genes *HOM* de *Drosophila* tanto em seqüência quanto em arranjo (ver adiante). Não só a estrutura dos genes *HOX*, mas também sua ação, foram incrivelmente conservadas durante centenas de milhões de anos.

Em *Drosophila*, há um único grupo de oito genes *HOM*. Nos humanos e em outros animais, existem quatro grupos, chamados de *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*, nos quais cada grupo contém até 11 genes individuais (Fig. 17.7). As combinações únicas de expressão de gene *HOX* em pequenos grupos de células que constituem regiões particulares do embrião ajudam a selecionar o destino do desenvolvimento destas regiões. Os grupos *HOXA* e *HOXB*, por exemplo, atuam ao longo do eixo rostral-caudal para determinar a identidade de vértebras e somitos individuais, enquanto os grupos *HOXA* e *HOXB* determinam a identidade regional ao longo dos eixos do membro em desenvolvimento (Fig. 17.7).

Exemplo: Mutações HOXD13 e Simpolidactilia

Nos camundongos, as mutações de perda de função foram geradas para quase todos os genes *HOX*, e as transformações homeóticas de segmentos vertebrais, espinhais ou ambos, em geral são observadas para membros dos grupos *HOXA*, *HOXB* ou *HOXC*. Nos humanos (e nos camundongos), uma mutação incomum de *HOXD13* causa simpolidactilia, uma condição semidominante na qual os heterozigotos têm interfalanges aladas e dedos extras nas mãos e pés. Os raros homozigotos têm anomalias similares, mas mais graves, e também apresentam malformações ósseas das mãos, dos pulsos, pés e tornozelos (Fig. 17.8). A mutação *HOXD13* responsável pela simpolidactilia em humanos e camundongos é causada pela expansão de polialanina no domínio aminoterminal da proteína. A proteína normal possui 15 alaninas, enquanto a proteína mutante contém de 22 a 24 alaninas. As mutações de perda de função de *HOXD13* têm apenas um pequeno efeito no desenvolvimento dos membros. Assim, a expan-

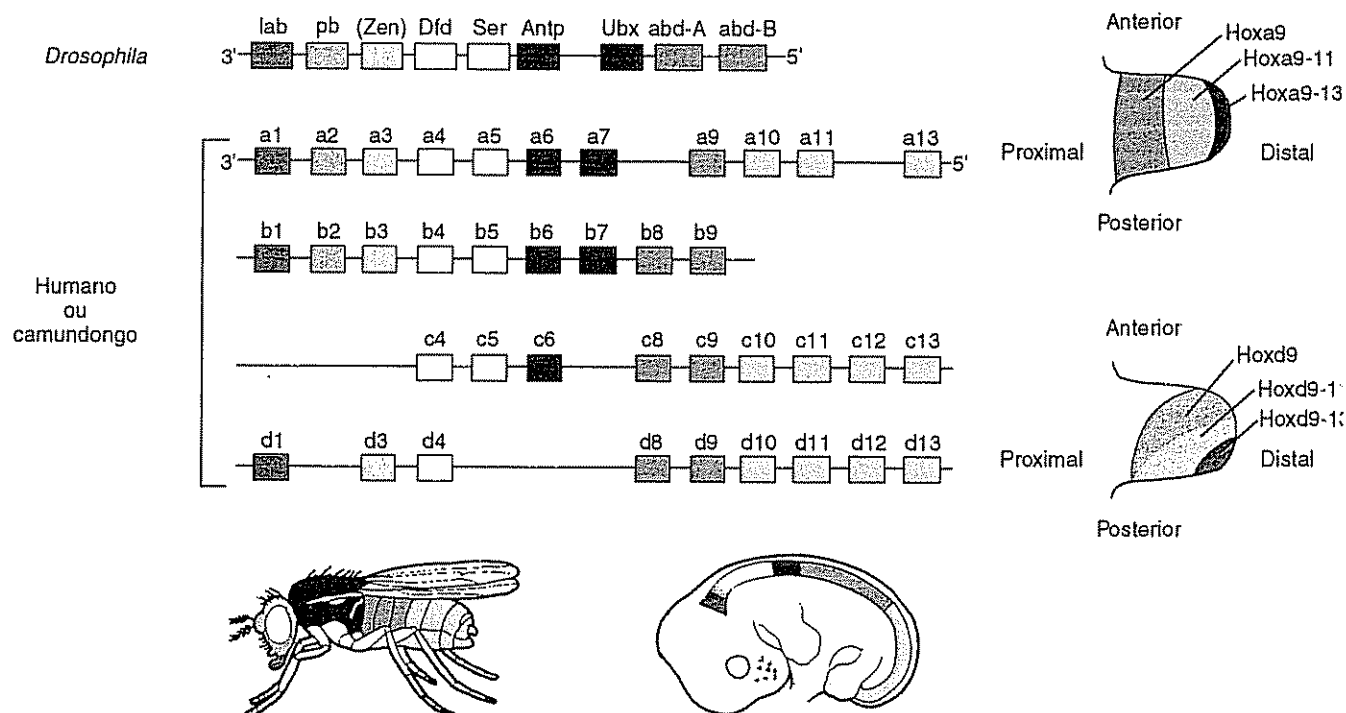



Fig. 17.7 Ação e arranjo dos genes HOX. Um grupo ancestral HOX em um ancestral comum de vertebrados e invertebrados foi quadruplicado nos mamíferos e os membros individuais do grupo ancestral foi perdido. A combinação de genes HOX expressa em regiões adjacentes ao longo do eixo ântero-posterior dos embriões em desenvolvimento escolhe um destino único de desenvolvimento. Nos membros em desenvolvimento, combinações diferentes de genes HOXA e HOXD são expressas em zonas adjacentes que ajudam a selecionar o destino do desenvolvimento ao longo dos eixos proximal-distal e ântero-posterior. (Figura reimpressa com permissão de Wolpert L., Beddington R., Brockes J., *et al.* [1998] Principles of Development. Copyright 1998, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.)

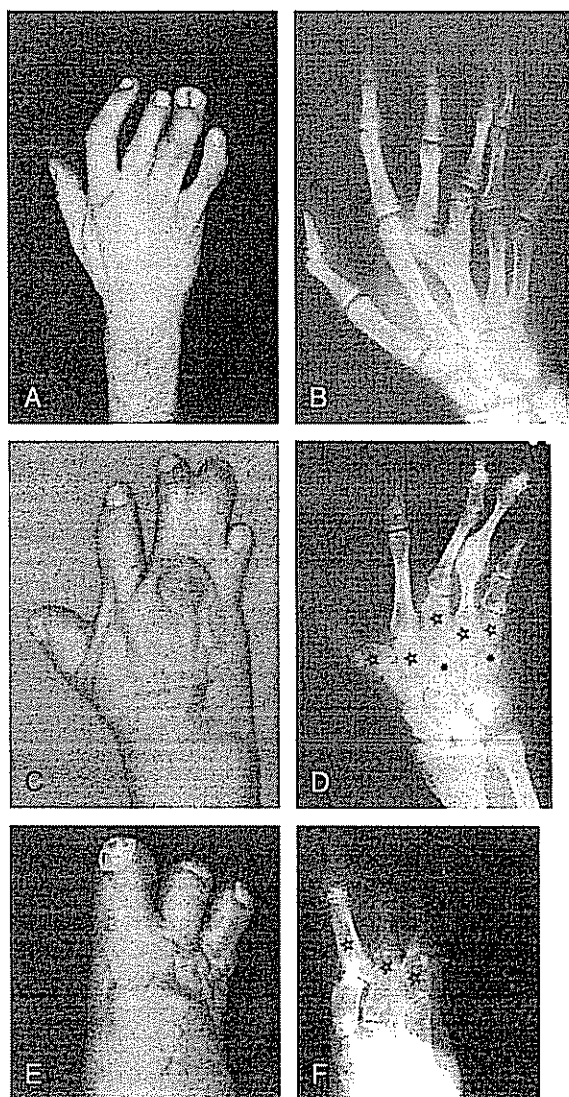



Fig. 17.8 Uma mutação incomum de ganho de função em *HOXD13* cria uma proteína anormal que tem um efeito semidominante (Figura reimpressa com permissão de Muragaki Y. Mundlos S. Upton J. Olsen B (1996) Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13 Science 272:548-551 Copyright 1996. American Association for the Advancement of Science)

são de polialalina que causa simpolidactilia deve agir por um mecanismo de ganho de função. Curiosamente, os camundongos que têm múltiplas mutações de perda de função em *HOXD11*, *HOXD12* e *HOXD13* apresentam anomalias muito similares às causadas pela expansão de polialanina de *HOXD13*, o que sugere que as proteínas hoxd11, hoxd12 e hoxd13 podem agir normalmente como complexos heterodiméricos e que a expansão de polialalanina de *HOXD13* interfere na função de todas as três proteínas. Independente do mecanismo exato, uma função geral dos genes *HOX* em todos os animais é determinar a identidade regional juntamente com os eixos corpóreos específicos durante o desenvolvimento.

Sinais Parácrinos no Desenvolvimento

As proteínas box e outros fatores de transcrição que afetam o desenvolvimento o fazem de uma maneira com autonomia celular: os alvos imediatos de sua ação são as células dentro das quais elas se expressam. Um aspecto crítico e essencial do desenvolvimento, entretanto, é uma interação instrucional entre as células, por meio da qual uma proteína secretada por um grupo de células altera o padrão de expressão gênica das células adjacentes, um processo que é claramente sem autonomia celular. Alguns sinais extracelulares de curto alcance, ou **parácrinos**, controlam mudanças simples liga ou desliga. Outros, chamados de **morfógenos**, podem elicitar respostas múltiplas, dependendo de seu nível ao longo de um gradiente de concentração. Deste modo, uma célula ou um grupo de células que secrete um morfógeno pode iniciar vários tipos de programas de desenvolvimento em células vizinhas, dependendo de sua localização ao longo do gradiente do morfógeno.

Exemplo: O Morfógeno Sonic Hedgehog e a Prosencefalia

Um dos melhores exemplos de um morfógeno desenvolvimental é o gene *hedgehog*, originalmente descoberto em *Drosophila* e assim denominado por sua capacidade de alterar a orientação das cerdas epidérmicas. A difusão da proteína *hedgehog* cria um gradiente no qual concentrações diferentes da proteína fazem com que as células vizinhas assumam destinos diferentes. Nos humanos, vários genes intimamente relacionados a *hedgehog* de *Drosophila* também codificam morfógenos desenvolvimentais. Um exemplo é o gene extravagantemente chamado de *Sonic hedgehog (SHH)*. Embora os programas específicos controlados por *hedgehog* em *Drosophila* sejam bem diferentes dos controlados por suas contrapartes nos mamíferos, os temas subjacentes são muito similares. Por exemplo, a secreção da proteína Sonic hedgehog pelo notocórdio e pela placa do assoalho do tubo neural em desenvolvimento resulta em um gradiente que induz e organiza os diferentes tipos de células e tecidos no cérebro e na coluna dorsal em desenvolvimento (Fig. 17.9). Sonic hedgehog também é produzida por um pequeno grupo de células no broto do membro para criar o que é conhecido como a **zona de atividade polarizadora**, que é responsável pelo padrão assimétrico dos dedos dentre os membros individuais.

As mutações que inativam *SHH* nos seres humanos são herdadas de modo dominante, o que demonstra que uma redução de 50% na expressão gênica é suficiente para produzir um fenótipo anormal, supostamente alterando a magnitude do gradiente da proteína hedgehog. As pessoas afetadas em geral apresentam **holoprosencefalia**, ou falha no desenvolvimento da face média e do prosencéfalo, o que leva à fenda labial e palatina, ao hipotelorismo (espaço curto entre os olhos) e à ausência de estruturas do prosencéfalo Ocasionalmente, entretanto, os achados clínicos são muito brandos ou sutis, tais como um único incisivo central ou a ausência parcial do *corpus callosum* (Fig. 17.10). Como tem sido observada uma expressividade variável nos membros da mesma família, ela não pode ser decorrente de mutações diferentes e deve refletir a ação de genes modificadores em outros loci, ou do acaso, ou ambos. A propensão de um processo genético a fatores que modificam o fenótipo mutante é uma característica importante não só da via de *SHH* e holoprosencefalia, mas também de outras vias nas quais os morfógenos desenvolvimentais estão implicados, tais como a fusão dos coxins endocárdicos e a ramificação dos túbulos epiteliais que ocorre durante o desenvolvimento de órgãos tais como os pulmões e os rins.

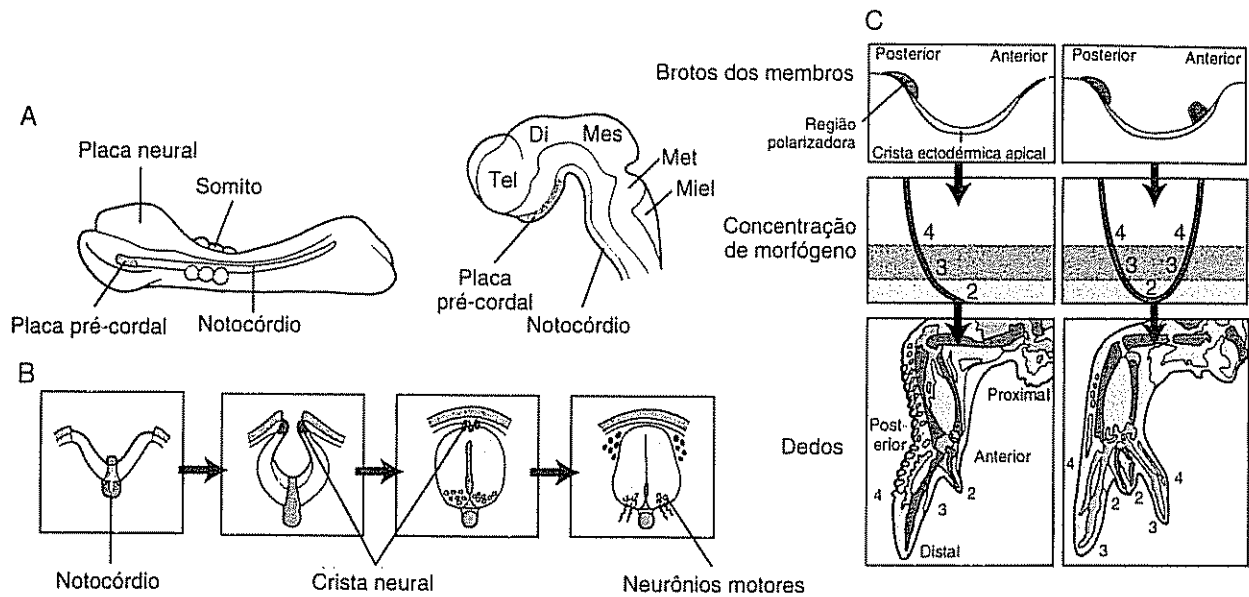



Fig. 17.9 Ação de morfógenos durante a formação do tubo neural e dos membros *A*, Desenvolvimento do tubo neural da 3.ª a 5.ª semana de desenvolvimento. O dobramento e a fusão do sulco neural na formação do tubo neural é rapidamente seguida do desenvolvimento das vesículas cerebrais das quais o cérebro finalmente se desenvolve. B, Seção transversa de desenvolvimento do tubo neural. A proteína *sonic hedgehog* liberada pelo notocórdio difunde-se para a porção ventral do tubo neural em desenvolvimento (cinza-escuro). As altas concentrações imediatamente acima do notocórdio induzem a placa do assoalho, enquanto as baixas concentrações mais laterais induzem os neurônios motores. O ectoderma acima (dorsal a) do tubo neural libera proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que ajudam a induzir o desenvolvimento da crista neural na margem dorsal do tubo neural em fechamento. (Figuras reimpressas com permissão de Muenke M., Beachy P. A. [2000] Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. Curr Opin Genet Dev 10:262-269. Copyright 2000 Elsevier Science; e de Lumsden A., Graham A. [1995] Neural Patterning: A forward role for hedgehog. Curr Biol 5:1347-1350. Copyright 1995 Elsevier Science.) *C*, Ação morfogenética da proteína *sonic hedgehog* durante a formação do broto dos membros, onde é liberada pela região polarizadora no membro posterior, conhecida como zona de atividade polarizadora, para produzir um gradiente (mostrado com seu alto nível 4 declinando para 2). As mutações dos experimentos de transplante que criam uma região polarizadora ectópica no broto do membro anterior causam uma duplicação dos elementos do membro posterior. (Figura reimpressa com permissão de Wolpert L., Beddington R., Brockes J., *et al* [1998] Principles of Development. Copyright 1998, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.)

Integração de Vias de Sinalização no Desenvolvimento

Como já foi descrito, os fatores de transcrição que controlam a expressão dos múltiplos genes seguintes fornecem uma base molecular para efetuar os programas de desenvolvimento da autonomia celular. Em contraste, as moléculas de sinalização parácrina fornecem uma base molecular na qual um grupo de células controla o programa de desenvolvimento de um grupo adjacente. Sob a perspectiva bioquímica, as moléculas de sinalização parácrina devem ter um receptor específico em sua célula-alvo, receptor este que deve se acoplar a um ou mais efetores

Fig. 17.10 Expressividade variável de uma mutação *SHH*. A mãe e sua filha têm a mesma mutação de sentido trocado em *SHH*, mas a filha é gravemente afetada por microcefalia, hipertelorismo e palato fendido, enquanto a única manifestação na mãe é um único incisivo superior central. (Reimpresso com permissão de Roessler E., Belloni E., Gaudenz K., *et al* [1996] Mutations in the human sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. Nat Genet 14:357-360, copyright 1996 Macmillan Ltd.)

intracelulares, e estes efetores devem levar a mudanças na atividade do fator ou fatores de transcrição-alvo. Um tema subjacente à genética do desenvolvimento é que todas as vias de sinalização são conservadas, das moléculas de sinalização parácrina até os fatores de transcrição-alvo. Tais **vias de sinalização do desenvolvimento** são usadas repetidamente para diferentes programas morfogenéticos dentro de um embrião e programas morfogenéticos homólogos em embriões de espécies diferentes.

GENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO NA PRÁTICA CLÍNICA

Os fundamentos da genética do desenvolvimento são usados implicitamente por qualquer profissional de cuidados de saúde que lide com crianças e defeitos de nascimento. Entre os principais defeitos de nascimento, os desequilíbrios cromossômicos são responsáveis por cerca de 25%, a exposição a teratógenos conhecidos por aproximadamente 5% e genes isolados por cerca de 20% (Fig. 17.11). Muitos desta última classe representam condições autossômicas dominantes com taxas relativamente altas de mutações novas, tais como a neurofibromatose tipo 1, a síndrome de Marfan e a acondroplasia (ver Cap. 5), e apenas uma pequena proporção se deve a anomalias mendelianas em genes de controle do desenvolvimento, tais como *SHH* e *PAX6*. Entretanto, grandes defeitos de nascimento sem causa identificável ocorrem em um padrão familiar similar ao das doenças multifatoriais tais como a diabetes e a doença mental (ver Cap. 15). Estudos de associação de genomas inteiros que serão feitos nos próximos anos poderão revelar polimorfismos em nucleotídeos únicos em genes de controle do desenvolvimento que alteram parcialmente sua função e, portanto, revelam etiologias poligênicas para os 50% dos defeitos de nascimento cujas causas específicas hoje são desconhecidas.

Dismorfologia

A **dismorfologia** é o ramo da genética clínica que se especializa nos defeitos de nascimento e combina um conhecimento

Fig. 17.11 Causas e padrões fenotípicos dos defeitos de nascimento

dos princípios genéticos, dos mecanismos de desenvolvimento e da história natural de uma ampla variedade de anomalias congênitas. Em algumas instituições, os dismorfologistas trabalham em conjunto com os especialistas em cirurgia pediátrica, medicina de reabilitação e profissionais correlatos de saúde para dar cuidados continuados às crianças com sérios defeitos de nascimento.

Defeitos Isolados de Nascimento, Síndromes e Seqüências

Cerca de 60% dos grandes defeitos de nascimento afetam um único sistema orgânico, tal como o coração (p.ex., defeitos de septo ventricular) ou o lábio (p.ex., fenda labial com ou sem palato fendido). Os casos destes chamados defeitos isolados de nascimento são os mais difíceis de se identificar. Dos restantes, muitos ocorrem em padrões reconhecíveis que destacam uma etiologia única e representam as chamadas **síndromes malformativas** (ver Quadro 17.1). Como os desequilíbrios cromossômicos, que representam uma classe especial de síndromes malformativas, diferentes pessoas afetadas pela mesma síndrome raramente têm o mesmo conjunto de defeitos de nascimento, e é apenas no contexto de muitas pessoas afetadas que os padrões tornam-se aparentes. Por exemplo, uma condição cuja causa é desconhecida, a **síndrome de Cornelia de Lange**, é caracterizada por retardo de crescimento, retardo mental, hirsutismo, criptorquidismo, deficiências dos membros superiores e características faciais com sinofre (crescimento excessivo de sombrancelhas para o centro da face), ponte nasal baixa, nostrilos antevertidos, um filtro longo e lábio superior fino, com os cantos inclinados para baixo (Fig. 17.12). A maioria das crianças afetadas pela síndrome de Cornelia de Lange ou síndrome de Rubenstein-Taybi (já discutida; ver Fig. 17.4) manifesta apenas um subgrupo de achados, cada um dos quais com expressividade variável. Outras pessoas com uma destas condições são quase sempre reconhecidas por sua constelação de características, e as duas síndromes são facilmente distinguíveis.

Alguns defeitos de nascimento ocorrem em padrões que apontam para um mecanismo fisiopatológico comum, muito embora possam se dever a mais de uma causa. Tais condições em geral são descritas como **seqüências** ou **associações**, para distinguilas das síndromes malformativas que têm uma causa única. Por exemplo, uma restrição do crescimento mandibular antes da nona semana de gestação pode fazer com que a língua fique mais posterior que o normal, interferindo no fechamento normal do palato (Fig. 17.13). A constelação de palato fendido em forma de U e uma mandíbula pequena é descrita como **seqüência de Robin**. Este fenótipo pode representar um defeito de nascimento isolado de causa desconhecida, pode se dever a uma colisão extrínseca na mandíbula em desenvolvimento por um gêmeo ou pode ser uma das várias características de uma condição conhecida como **síndrome de Stickler**, em geral causada por uma anomalia subjacente do colágeno tipo II. A fenda ocorre via um mecanismo fisiopatológico comum. Entretanto, são necessários conhecimentos de dismorfologia e dos princípios de genética do desenvolvimento para que se possa diagnosticar apropriadamente as condições e reconhecer que prognósticos diferentes dependem da etiologia primária.

Malformações, Deformações e Disrupções

As malformações representam anomalias intrínsecas no desenvolvimento e em geral podem ser distintas das anomalias causa-

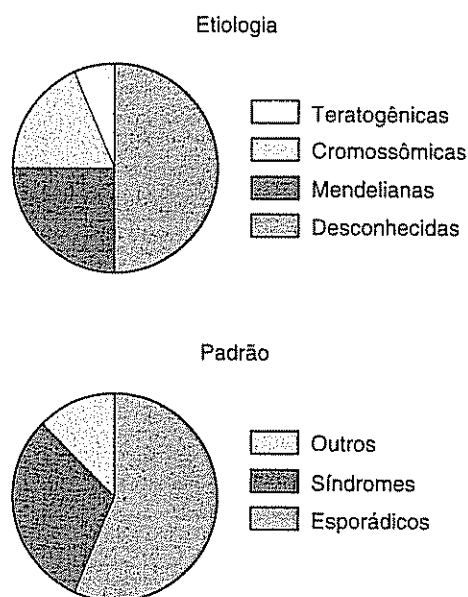



Fig. 17.12 Na síndrome de Cornelia de Lange, as pessoas afetadas em geral podem ser reconhecidas por um aspecto facial característico, mas outras manifestações da condição, tais como deformidades dos membros superiores, têm expressividade variável (De Ptacek L J *et al* [1963] J Pediatric 63:1000)

das por fatores extrínsecos, ou as chamadas **deformações** (Fig. 17.14A). As deformações são especialmente comuns durante o segundo trimestre de desenvolvimento quando o feto é comprimido no saco amniótico e no útero. Alguns tipos de deformações ocorrem mais comumente que outras e podem ser reconhecidas por seus padrões. Por exemplo, as contrações dos membros inferiores, ou **artrogriposes**, em combinação com a deformação do crânio em desenvolvimento, ocasionalmente acompanham a restrição do feto decorrente de nascimentos múltiplos ou vazamento prolongado de líquido amniótico.

A maioria das deformações aparentes ao nascimento resolve-se espontaneamente ou pode ser tratada por aparelhos de fixação externa para reverter os efeitos da causa instigante. Outro tipo de defeito de nascimento, resultante de **disrupção** do tecido em desenvolvimento, é mais difícil de tratar porque o tecido normal é destruído (Fig. 17.14A). Embora tanto as deformações quanto as disrupções ocorram em padrões reconhecíveis, suas manifestações tendem a ser irregulares e assimétricas, se comparadas às síndromes malformativas. Por exemplo, a ruptura parcial do saco amniótico pode fazer com que fragmentos da membrana prejudiquem ou causem constrições ao desenvolvimento dos membros ou, ocasionalmente, à região orofacial. A seqüência de disrupção amniótica em geral é reconhecida clinicamente pela presença de amputações parciais e irregulares de dedos em conjunto com anéis de constrição (Fig. 17.14B). Os conceitos fisiopatológicos das malformações, deformações e disrupções são orientações clínicas úteis para o reconhecimento, o diagnóstico e o tratamento dos defeitos de nascimento, mas eles às vezes se sobrepõem. Por exemplo, a ruptura do âmnio pode ser causada por uma anomalia intrínseca do tecido conjuntivo e pode levar à destruição do tecido fetal em algumas regiões, mas a deformações em outras.

TERATOLOGIA

A identificação e a compreensão dos mecanismos dos chamados **teratógenos** — drogas, infecções ou agentes ambientais que

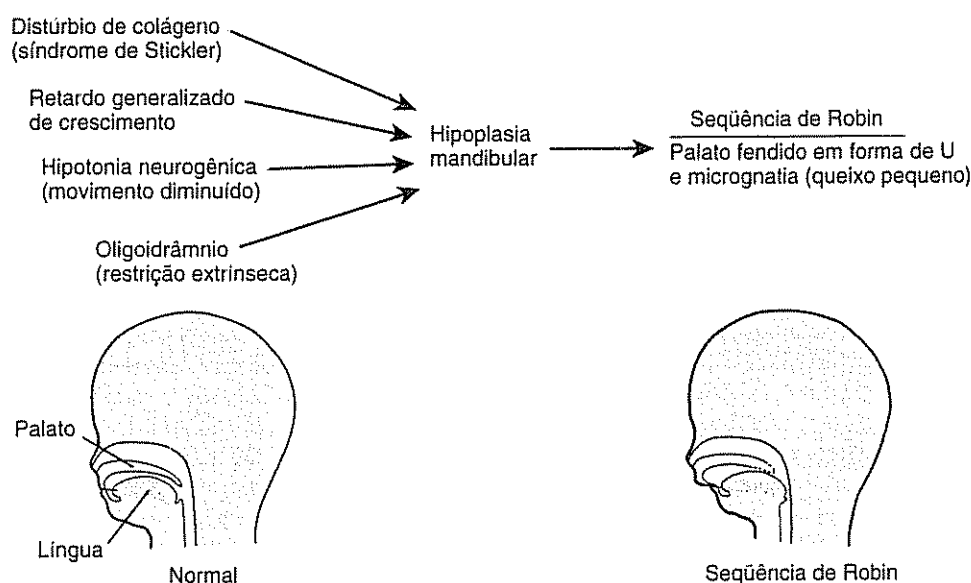



Fig. 17.13 A anomalia de Robin como exemplo de uma seqüência dismorfológica Diferentes anomalias primárias podem levar a uma restrição do crescimento mandibular no qual o deslocamento posterior da língua obstrui o fechamento do palato, levando ao palato fendido em forma de U e a um queixo pequeno (o palato fendido que não é causado por hipoplasia mandibular em geral é em forma de V) Se a etiologia primária da micrognatia (um queixo pequeno) em crianças com a seqüência de Robin for causada por deformação externa, tal como oligoidrâmnio, a mandíbula em geral apresentará crescimento pós-natal

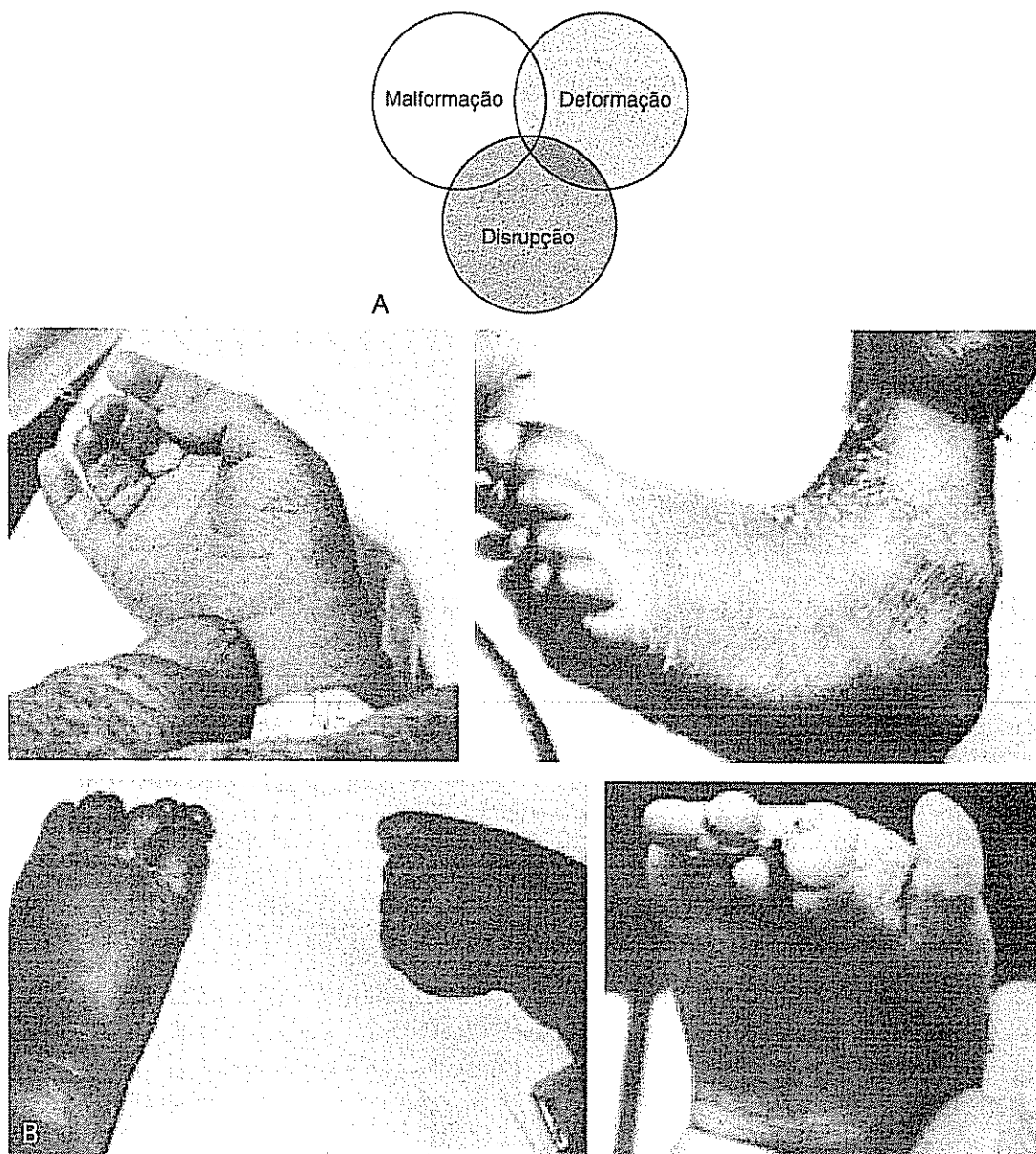



Fig. 17.14 A. A seqüência de disrupção amniótica pode envolver várias vias patogenéticas Como descrito no texto. as malformações. deformações e disrupções são guias clínicos úteis para explicar a fisiopatologia dos defeitos de nascimento. mas os conceitos ocasionalmente se superpõem B. Seqüência de ruptura inicial do âmnio As conseqüências da seqüência de disrupção do âmnio podem ser reconhecidas pelo padrão assimétrico e irregular das anomalias. pela ausência de tecido normal e pelas conseqüências da compressão externa ou constrição no útero Anomalias variáveis dos membros secundárias a bridas, incluindo pseudosindactilia. constrição do tornozelo e amputação com disrupção do desenvolvimento de dedo (B de Jones K L. *et al* (1974) Pediatric 84:90)

causam defeitos de nascimento — têm implicações importantes tanto para a medicina clínica quanto para a ciência básica. Reconhecer os efeitos teratogênicos de drogas ou toxinas ambientais tem ramificações óbvias para a saúde pública, e compreender os mecanismos da teratogenicidade pode nos dar *insights* das vias de desenvolvimento subjacentes que deram errado. Como muitas vias moleculares e celulares usadas durante o desenvolvimento são únicas, os teratógenos que causam sérios defeitos de nascimento podem ter poucos — ou nenhum — efeitos colaterais em pacientes adultos. Um dos melhores exemplos é a talidomida, um sedativo usado na década 1950, que depois se viu que causava uma incidência muito alta de defeitos de redução de membros nos fetos expostos entre a 4.ª e 8.ª semanas de gestação. A talidomida parece não agir interferindo no número ou no padrão dos dedos, mas sim danificando os tecidos dentro do centro de proliferação, ou **zona de progresso**, do broto do membro em desenvolvimento (Fig. 17.15). Este efeito é específico. A talidomida é uma droga relativamente segura fora de seus efeitos teratogênicos e, de fato, é muito útil para o tratamento de algumas anomalias do sistema imune associadas à excessiva proliferação celular. De modo similar, a exposição a alguns derivados de ácido retinóico no útero pode causar uma variedade de graves defeitos de nascimento, provavelmente porque os retinóides endógenos são um componente fundamental das vias de sinalização usadas para padronizar os arcos branquiais. Os retinóides têm alguns efeitos colaterais não-teratogênicos e são extremamente úteis para tratar algumas doenças de pele e formas raras de leucemia.

Uma distinção fundamental entre os defeitos de nascimento causados por teratógenos e mutágenos é que os mutágenos causam danos criando alterações herdáveis no material genético, enquanto os teratógenos atuam direta e transientemente no tecido embrionário em desenvolvimento. Assim, a exposição a um mutágeno pode causar um aumento de risco de defeitos de nascimento durante a vida da pessoa exposta, enquanto a exposição a um teratógeno aumenta o risco de defeitos de nascimento para a gestação em curso, mas não para as gestações subseqüentes.

Teratógenos diferentes em geral causam padrões muito específicos de defeitos de nascimento, cujos riscos dependem de forma crucial do tempo e do nível de exposição durante a gestação. Assim, os dismorfologistas ou geneticistas clínicos em geral diagnosticam os defeitos de nascimento induzidos por teratógenos pelo padrão das anomalias, explicam suas causas e conseqüências, dão consultas às famílias quanto ao risco de recorrência quando já nasceu uma criança afetada e, para os casais em que a grávida inadvertidamente pode ter sido exposta a um teratógeno, dão uma consulta de probabilidade baseada no nível e na época da exposição.

Genética Reprodutiva

Muitos defeitos de nascimento tornam-se aparentes durante a gestação devido ao crescimento fetal reduzido ou às anomalias detectadas na sonografia de rotina (ver Cap. 18). Os geneticistas clínicos e dismorfologistas em geral trabalham junto com obstetras e especialistas em medicina materno-fetal para avaliar anomalias detectadas no útero. O envolvimento de geneticistas clínicos é especialmente importante para casos de abortos espontâneos inexplicados, pois uma grande proporção destes abortos é causada por aneuploidias cromossômicas (ver Fig. 17.11). O reconhecimento de que o aborto espontâneo ou natimorto foi causado por uma síndrome malformativa ou anomalia cromossômica pode dar um risco de recorrência preciso em uma consulta a membros de uma família, aliviar uma culpa pessoal injustificada que pode acompanhar os abortos espontâneos ou natimortos e, em alguns casos, criar a oportunidade de um diagnóstico pré-natal precoce em futuras gestações. Mesmo nos casos nos quais se sabe que um aborto espontâneo ou natimorto tem um cariótipo normal — por exemplo, quando foram feitas amniocentese ou punção de vilosidades coriônicas devido à idade materna avançada — o exame do feto e da placenta por um geneticista clínico pode ser muito útil, por exemplo, para diagnosticar anomalias óbvias, tais como a holoprosencefalia ou a disrupção amniótica.

Entre as anomalias mais comuns que se desenvolvem no útero estão as secundárias à gemelaridade monozigótica. Cerca de um terço das vezes, o evento de gemelaridade é relativamente precoce, ocorrendo antes da formação do trofoblasto, de modo que cada zigoto forma seu próprio conjunto de tecidos extraembrionários e os gêmeos são ditos como sendo dicoriônicos (Fig. 17.16). No restante do tempo, o evento de gemelaridade envolve apenas a massa celular interna e ocorre após a formação do trofoblasto, e neste caso os gêmeos compartilham uma placenta comum e são ditos como sendo monocoriônicos (mas diamnióticos). Raramente, a gemelaridade ocorre na implantação — ou logo depois dela — e envolve apenas o ectoderma primitivo, e neste caso os gêmeos podem compartilhar membranas amnióticas, bem como coriônicas. Os gêmeos monocoriônicos (tanto diamnióticos quanto monoamnióticos) têm uma circulação placentária comum e, portanto, estão em risco de uma variedade de anomalias causadas por eventos tromboembolíticos ou por uma distribuição desigual de volume sanguíneo, ou ambos. Os gêmeos monoamnióticos correm um risco adicional de defeitos de nas-

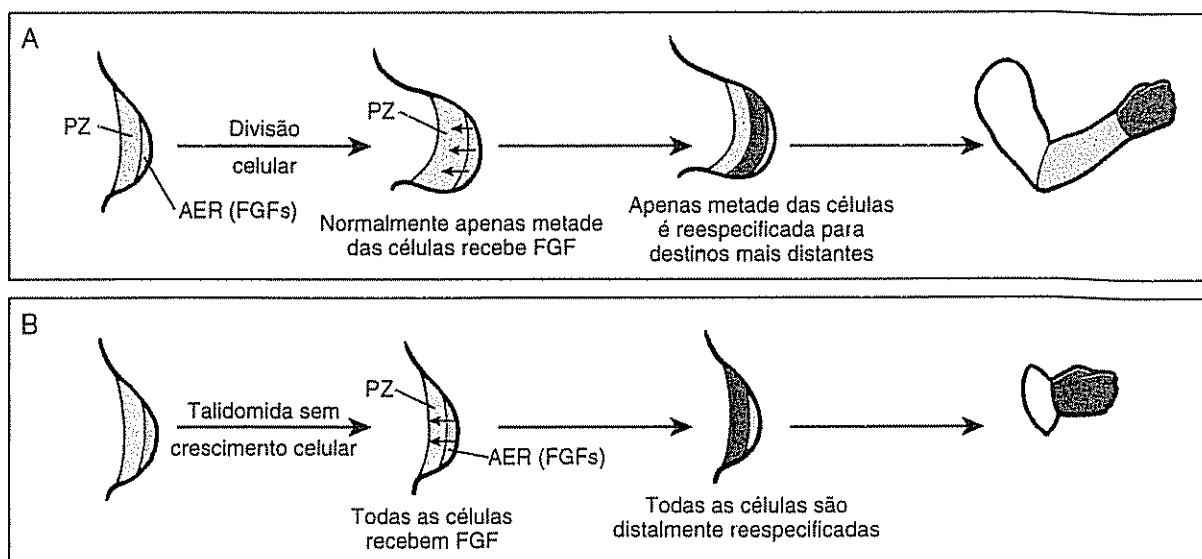



Fig. 17.15 Um mecanismo de desenvolvimento para a embriopatia induzida por talidomida. Um modelo para a especificação da identidade do membro ao longo do eixo proximal-distal mostra que os sinais difundíveis, incluindo os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) liberados da crista ectodérmica apical (AER) na ponta do membro em desenvolvimento, atuam localmente para especificar o destino das células mesenquimais subjacentes na zona de progresso (PZ). Se o crescimento na zona de progresso for prejudicado pela talidomida, toda a zona de progresso será submetida à ação de sinais indutores de AER, levando à "reespecificação distal". Este mecanismo manifesta-se clinicamente como ausência dos elementos dos membros proximais, mas não dos distais. (Reimpresso com permissão de Tabin C. J. [1998] A developmental model for thalidomide defects. Nature 396:322-323. Copyright 1998 Macmillan Magazines Ltd.)

cimento causados por deformação ou alocação desigual de células durante a gastrulação. Os eventos de gemelaridade que ocorrem durante a gastrulação são extremamente raros e provavelmente são responsáveis por vários tipos de gêmeos unidos.

Determinismo Genético e Processos Estocásticos no Desenvolvimento

"Por que isto ocorreu?" é uma das primeiras perguntas feitas pela maioria das famílias quando nasce uma criança com um defeito de nascimento, mas o médico geneticista só pode dar uma resposta geral em cerca da metade das vezes (ver Fig. 17.11). Mesmo para os defeitos de nascimento nos quais a etiologia é conhecida, a expressividade pode variar muito, e a procura por uma explicação subjacente pode ser frustrante tanto para o paciente quanto para o médico. Uma suposição em tal "procura" é que exista uma explicação. Em outras palavras, que o conhecimento suficiente dos parâmetros genéticos ou ambientais, ou ambos, de uma célula, órgão ou embrião permita fazer uma previsão determinística do eventual fenótipo. Um certo nível de determinismo, obviamente, é a base da genética. A noção de que uma combinação de variáveis genotípicas e ambientais fornece uma previsão da variação fenotípica e da doença é um ponto fundamental de toda a biologia. Entretanto, tais previsões nem sempre são absolutas, particularmente quando se referem à variação desenvolvimental. O efeito do acaso no desenvolvimento é entendido com mais facilidade considerando-se os gêmeos humanos ou os animais endocruzados em uma situação na qual ocorre pouca ou nenhuma variação ambiental. Os gêmeos monozigóticos quase sempre são mais similares entre si que os gêmeos dizigóticos, mas diferenças residuais, tais como impressões digitais e sinais de nascimento, por exemplo, só podem ser explicadas pelo acaso.

As impressões digitais e os sinais de nascimento provavelmente são representantes de muitos processos de desenvolvimentos quando vistos por uma certa perspectiva. Assim, a habilidade em prever o fenótipo de uma célula ou o potencial fenotípico de um embrião em desenvolvimento em geral, mas nem sempre, é uma função do genótipo desta célula e de sua posição no espaço e no tempo, isto é, de seu ambiente (ver Fig. 17.1). Por exemplo, é impossível prever qual das células de um embrião de quatro células originará a massa celular interna ou o trofoblasto (ver Fig. 17.3) e é impossível prever quais células da massa celular interna de um embrião feminino terão inativado o cromossomo X de origem paterna ou materna (ver Cap. 10). Um processo que não pode ser previsto pelos eventos que o precedem é dito como sendo **estocástico** e caracteriza muitos aspectos do desenvolvimento inicial dos mamíferos. Compreender a natureza estocástica destes processos é essencial no cuidado de pacientes afetados por anomalias de desenvolvimento causadas por genes, ambiente ou acaso.

AVANÇOS RECENTES NA GENÉTICA DO DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÕES POTENCIAIS

Grande parte de nossa compreensão dos mecanismos que guiam o desenvolvimento embrionário humano depende dos estudos feitos em organismos-modelo. Os organismos-modelo de invertebrados, tais como a mosca-das-frutas e os vermes, são muito úteis devido aos poderosos métodos experimentais genéticos e embriológicos que podem surgir e porque muitos mecanismos moleculares e celulares que funcionam durante o desenvolvimento humano também são usados durante o desenvolvimento dos invertebrados. Os organismos-modelo de mamíferos, tais como camundongos e ratos, também são úteis, pois as interações tissulares e os movimentos são conservados. O desenvolvimento do coração, do cérebro, do fígado e dos pulmões nos embriões de camundongo, por exemplo, ocorre quase do mesmo modo (mas em uma escala de tempo maior) nos embriões humanos. Os organismos-modelo não só fornecem ferramentas para compreender o desenvolvimento humano, como também são uma plataforma e fornecem uma base para o desenvolvimento de novas terapias relevantes ao transplante e à regeneração de órgãos. Duas

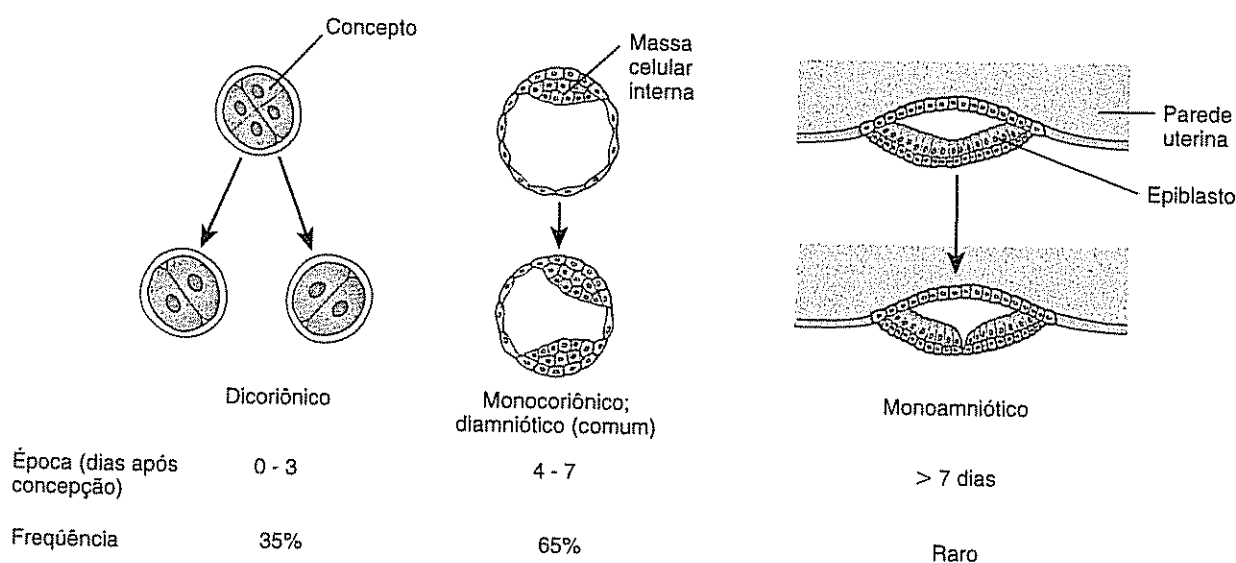



Fig. 17.16 A disposição das membranas placentárias nos gêmeos monozigóticos depende da época do evento de gemelaridade. Os gêmeos dicoriônicos resultam de uma divisão completa de todo o embrião, levando a uma duplicação de todos os tecidos extra-embrionários. Os gêmeos monocoriônicos diamnióticos são causados pela divisão da massa celular interna no estágio de blastocisto. Os gêmeos monoamnióticos são causados pela divisão do epiblasto no estágio cilíndrico.

áreas nas quais o progresso tem sido especialmente notável são as células-tronco embrionárias e a clonagem.

Células-tronco Embrionárias

A tecnologia de produção de animais a partir de células embrionárias indiferenciadas em cultura de tecidos é fruto de estudos feitos em teratocarcinomas humanos e de camundongo. Estes tumores incomuns foram originalmente reconhecidos porque consistem tanto em células indiferenciadas quanto em vários tipos de células diferenciadas. As células indiferenciadas de teratocarcinomas podem crescer em cultura e são pluripotentes porque vários tecidos reaparecem depois que as células cultivadas de teratocarcinomas são injetadas de volta nos embriões ou animais adultos (Fig. 17.17).

A capacidade de uma célula tumoral indiferenciada de se autorenovar e originar diferentes tipos de células genitoras comprometidas é reminiscente do comportamento de células-tronco normais, como já descrito. De fato, as células indiferenciadas de teratocarcinoma compartilham muitas características com as células embrionárias normais da massa celular interna do ectoderma primitivo. Não só as células do teratocarcinoma ocasionalmente contribuem para os tecidos adultos diferenciados após injeção em embriões, mas a massa celular interna normal injetada em tecidos adultos ocasionalmente dará origem a teratocarcinomas (Fig. 17.17).

As células do teratocarcinoma geralmente são aneuplóides. Entretanto, sob condições apropriadas, a massa celular interna normal pode ser explantada e mantida em cultura em um estado euplóide indiferenciado. As células derivadas deste modo são chamadas de **células-tronco embrionárias**. Elas podem ser cultivadas por muitas gerações, manipuladas em cultura e depois injetadas em embriões normais para produzir uma **quimera**, um único animal com contribuições de mais de um zigoto. Como os gametas produzidos por um animal quimérico podem ser derivados do embrião hospedeiro ou das células-tronco embrionárias, este conjunto de procedimentos pode ser usado para criar animais com alterações precisas do arranjo gênico, número de genes ou estrutura gênica.

A tecnologia de células-tronco embrionárias fornece um mecanismo para criar animais-modelo de importantes doenças genéticas humanas e, em muitos casos, forneceu um *insight* inesperado do papel de tais genes no desenvolvimento normal. Por exemplo, o gene *BRCA1* de suscetibilidade ao câncer é necessário tanto para o início do desenvolvimento embrionário quanto para a ramificação apropriada e arquitetura dos dutos mamários em desenvolvimento. A criação de modelos animais para doenças tais como a hemofilia ou a fibrose cística é um pré-requisito para o desenvolvimento e teste da terapia gênica. Além disso, a tecnologia de células-tronco embrionárias fornece um campo de testes para os esforços em corrigir defeitos genéticos *in utero*.

Clonagem Animal

As tentativas de contornar a fertilização reproduzindo organismos inteiros a partir de células somáticas diplóides estão no centro de uma das perguntas mais antigas da biologia do desenvolvimento: o programa da embriogênese está codificado no DNA, e este código é preservado nas células diferenciadas dos animais adultos? Os estudos realizados nos últimos anos responderam a ambas as perguntas afirmativamente em vários mamíferos diferentes, com implicações importantes em muitos aspectos da biologia e da medicina. Na maioria dos estudos, um núcleo de uma célula diplóide diferenciada, tal como um fibroblasto, uma célula epitelial de mama ou uma célula ovariana, é transplantado para um ovócito do qual foi removido o núcleo original. O zigoto recém-construído sofre então várias divisões em cultura e depois é transferido para um útero, onde se deixa que se implante e se desenvolva. O ambiente citoplasmático do ovócito é tido como fornecendo os componentes essenciais necessários para as primeiras divisões das células embrionárias, mas, com exceção das mitocôndrias, todos os componentes de um animal clonado são geneticamente codificados por um núcleo transplantado. Embora apenas uma pequena fração dos zigotos construídos por transplante nuclear se desenvolva com sucesso, os animais foram clonados de forma bem-sucedida usando-se núcleos diplóides de células de mamíferos, células *cumulus* do ovário e células-tronco embrionárias cultivadas. Assim, as mudanças epigenéticas necessárias para a organogênese, a diferenciação, a inativação do X e o *imprinting* genético não representam um obstáculo intransponível para recapitular todo o programa do desenvolvimento embrionário.

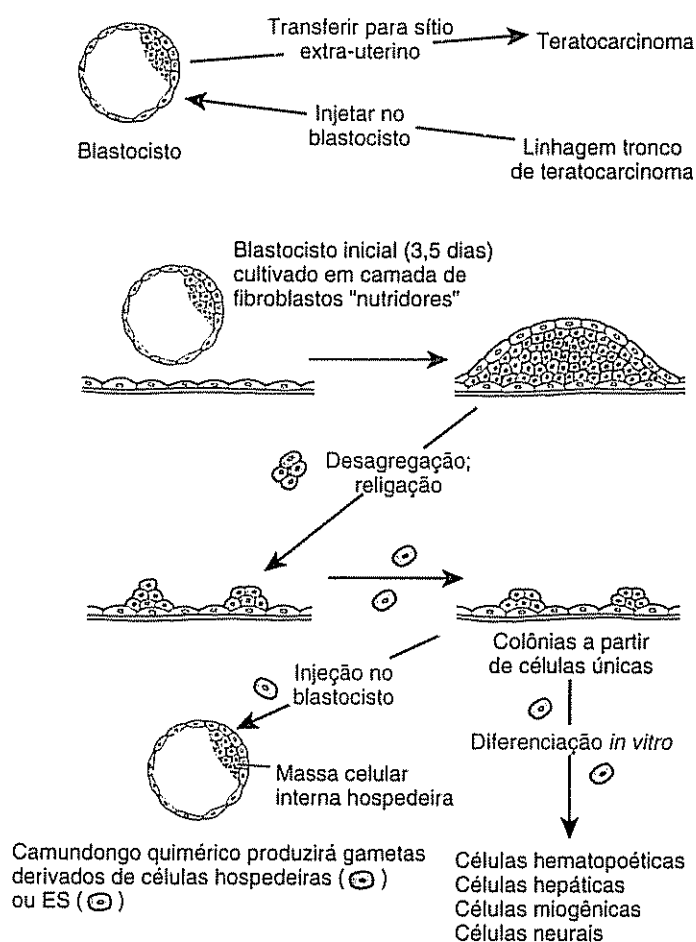



Fig. 17.17 Teratocarcinomas e células-tronco embrionárias. As células dos teratocarcinomas podem ser cultivadas e injetadas no blastocisto e darão origem a muitos tipos diferentes de tecidos. As células-tronco embrionárias compartilham muitas características com as células de teratocarcinoma, mas são derivadas diretamente da massa celular interna ou do ectoderma primitivo e, em contraste com as células do teratocarcinoma, em geral são euplóides e podem, portanto, contribuir para a linhagem germinativa. As culturas de células-tronco embrionárias diferenciadas *in vitro* podem originar uma variedade de tipos celulares diferentes.

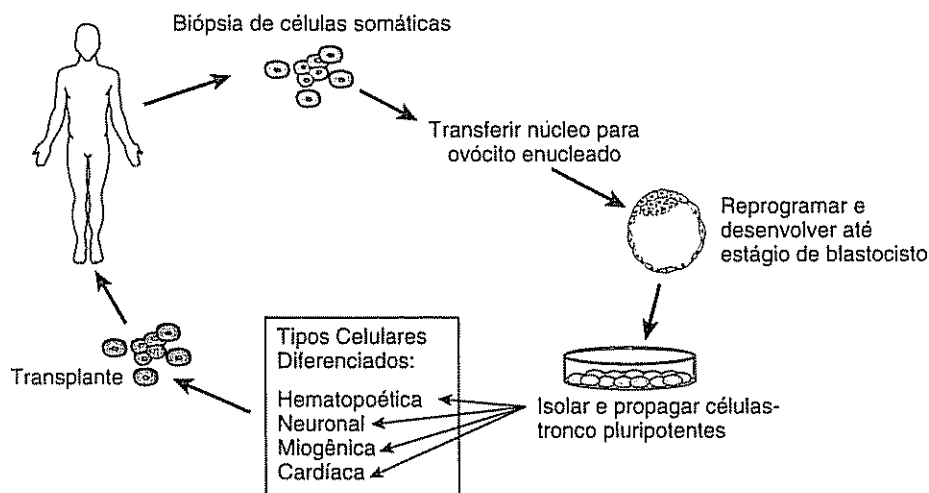



Fig. 17.18 Aplicação potencial da clonagem celular e tecnologia de células-tronco embrionárias para transplante de órgãos e tecidos (Figura reimpressa de Smith A (1998) Cell therapy: In search of pluripotency Curr Biol 8:R802-804 Copyright 1998. com permissão de Elsevier Science)

Genética do Desenvolvimento, Medicina e Sociedade

Uma das implicações mais destacadas da célula-tronco embrionária e da tecnologia de clonagem animal é o potencial de mudar o destino dos tecidos e órgãos transplantados (Fig. 17 18). Por exemplo, a diferenciação controlada das células-tronco embrionárias em células hematopoéticas e hepáticas pode fornecer uma fonte de transplantes de medula e de fígado que não necessite de doadores específicos, enquanto a capacidade de produzir neurônios em cultura de células pode criar novos meios de tratar muitas condições neurodegenerativas diferentes. Um problema científico importante é como a potencial rejeição imune das células animais transplantadas pode ser superada, pois as substituições de tecidos ou órgãos vivos desenvolvidos a partir de células-tronco embrionárias serão muito mais imunogênicas que, por exemplo, as valvas cardíacas porcinas tratadas quimicamente. Uma possível solução para este problema é desenvolver células-tronco embrionárias humanas das quais os principais genes codificantes da incompatibilidade tenham sido removidos. Uma segunda possibilidade é "humanizar" células-tronco embrionárias animais removendo todos os genes que codificam proteínas imunogênicas. Uma terceira possibilidade é usar a clonagem celular para desenvolver células-tronco embrionárias (e seus derivados diferenciados) da pessoa que precisa de um transplante (Fig. 17 18). Todos estes enfoques levantam dúvidas importantes de saúde pública e ética que devem ser cuidadosamente consideradas. Por exemplo, o transplante de células animais vivas para humanos está associado a um risco potencial de transmissão de agentes infecciosos atavés dos limites entre as espécies. Além disso, alguns tipos de experimentos podem estar associados ao risco de mutações gaméticas, e há um amplo consenso de que a alteração acidental ou deliberada de células germinativas humanas vai contra os princípios da moral e da ética. Como em muitas áreas da ciência, a tecnologia da genética do desenvolvimento não só oferece o potencial para grandes melhoras na saúde humana, como também nos coloca em confronto com novos conceitos e desafios que requerem educação, discussão e consenso entre cientistas, profissionais de saúde, pacientes e a sociedade em geral.

Referências Gerais

Epstein CJ (1991) Aneuploidy and morphogenesis Prog Clin Biol Res 373:1-18.

Epstein CJ (1995) The new dysmorphology: Application of insights from basic developmental biology to the understanding of human birth defects. Proc Natl Acad Sci U S A 92:8566-8573

Gilbert SF (1997) Developmental Biology Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Gurdon J (1999) Developmental biology and the redirection or replacement of cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 354:1967-1976.

Jones KL, Smith DW (1997) Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. WB Saunders, Philadelphia

Moore KL, Persaud TVN (1998) The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 6th ed WB Saunders, Philadelphia

Slack JMW (1991) From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development Developmental and Cell Biology Series Cambridge University Press, Cambridge, England and New York

Wilkins AS (1993) Genetic Analysis of Animal Development Wiley-Liss, New York

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, et al (1998) Principles of Development. Oxford University Press, Oxford, England

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Angrist M, Bolk S, Halushka M, et al (1996) Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient Nat Genet 14:341-344.

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J (2000) The GDNF family ligands and receptors—Implications for neural development Curr Opin Neurobiol 10:103-110

Capecchi MR (1997) Hox genes and mammalian development Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62:273-281.

Conway SJ, Henderson DJ, Copp AJ (1997) PAX3 is required for cardiac neural crest migration in the mouse: Evidence from the splotch (Sp2H) mutant Development 124:505-514.

Dale JK, Vesque C, Lints TJ, et al (1997) Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm Cell 90:257-269.

Doray B, Salomon R, Amiel J, et al (1998) Mutation of the RET ligand, neurturin, supports multigenic inheritance in Hirschsprung disease Hum Mol Genet 7:1449-1452.

Dlugosz A (1999) The hedgehog and the hair follicle: A growing relationship [comment] J Clin Invest 104:851-853.

Ezer S, Bayes M, Elomaa O, et al (1999) Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells Hum Mol Genet 8:2079–2086

Gehring WJ, Ikeo K (1999) Pax 6: Mastering eye morphogenesis and eye evolution Trends Genet 15:371–377

Grindley JC, Davidson DR, Hill RE (1995) The role of Pax-6 in eye and nasal development. Development 121:1433–1442.

Lumsden A, Graham A (1995) Neural patterning: A forward role for hedgehog. Curr Biol 5:1347–1350

Mansouri A, Hallonet M, Gruss P (1996) Pax genes and their roles in cell differentiation and development Curr Opin Cell Biol 8:851–857.

Ming JE, Roessler E, Muenke M (1998) Human developmental disorders and the sonic hedgehog pathway Mol Med Today 4:343–349

Muenke M, Beachy PA (2000) Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly Curr Opin Genet Dev 10:262–269

Muragaki Y, Mundlos S, Upton J, Olsen B (1996) Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. Science 272:548–551

Opdecamp K, Nakayama A, Nguyen MT, et al (1997) Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: Crucial dependence on the MITF basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. Development 124:2377–2386.

Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, et al (1999) The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations Am J Hum Genet 65:645–655.

Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, et al (1996) Mutations in the human sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly Nat Genet 14:357–360.

Smith A (1998) Cell therapy: In search of pluripotency Curr Biol 8:R802–804

Tabin CJ (1998) A developmental model for thalidomide defects Nature 396:322–323.

Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A (1996) Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development Anat Rec 245:151–161.

Wilmut I, Young L, Campbell KH (1998) Embryonic and somatic cell cloning Reprod Fertil Dev 10:639–643

Xu X, Wagner KU, Larson D, et al (1999) Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation Nat Genet 22:37–43

Problemas

1. Quais são as duas etapas pelas quais as células de um embrião sofrem comprometimento com um determinado destino? Como estas etapas são distintas experimentalmente? Qual o significado de separar estas duas etapas para a genética reprodutiva?

2. Correlacione os termos da coluna da esquerda com os que melhor se ajustam na coluna da direita

A	Desenvolvimento dependente de linhagem	1	Pluripotência
B	Desenvolvimento dependente de posição	2	Morfógeno
C	Desenvolvimento regulador	3	Regulação epigenética da expressão gênica
D	Células-tronco embrionárias	4	Gêmeos monozigóticos

3. O que distingue um morfógeno de um sinal parácrino?

4. Faça a correspondência dos itens da coluna esquerda com os termos que melhor se ajustam na coluna da direita

A	Brida aminiótica	1	Palato fendido em forma de U
B	Aniridia	2	Talidomida
C	Líquido amniótico inadequado	3	Mutação *PAX6*
D	Redução de membro	4	Disrupção
E	Seqüência de Robin	5	Deformação

5. Que tipos de células diplóides não seriam apropriadas como doadoras de núcleo em um experimento de clonagem animal e por quê?

6. Para discussão: No Cap 12, aprendemos sobre muitas mutações que causam doenças herdadas de modo autossômico recessivo Por que algumas mutações em fatores de transcrição resultam em defeitos de desenvolvimento mesmo quando presentes no estado heterozigoto?

Diagnóstico Pré-natal

O diagnóstico pré-natal começou em 1966, quando Steele e Breg mostraram que a constituição cromossômica de um feto podia ser determinada pela análise da cultura das células do líquido amniótico. Devido à associação entre a idade materna avançada e um aumento de risco de síndrome de Down já ser bem conhecida, seu relato levou diretamente ao desenvolvimento do diagnóstico pré-natal como um serviço médico. Este serviço requer a colaboração de várias disciplinas: obstetrícia; ultra-sonografia; genética clínica, para fins de avaliação, diagnóstico e consulta genética, e serviços laboratoriais. Devido à complexidade de integrar estas funções, o diagnóstico pré-natal geralmente é por encaminhamento a um programa multidisciplinar, no qual a genética tem uma parte essencial. O diagnóstico pré-natal já foi citado no contexto de muitos distúrbios genéticos específicos, e neste capítulo seu escopo, sua metodologia e suas limitações serão considerados em maiores detalhes.

A finalidade do diagnóstico pré-natal não é simplesmente detectar anomalias na vida fetal e levar ao término da gravidez quando o feto tem um defeito. As metas do diagnóstico pré-natal são as seguintes:

1. Fornecer uma faixa de escolhas informadas a casais em risco de ter um filho com uma anomalia.
2. Dar apoio e reduzir a ansiedade, especialmente entre os grupos de alto risco.
3. Permitir que os casais em risco de ter um filho com um defeito de nascimento específico, que de outro modo se antecipariam em ter um filho, iniciem uma gestação com o conhecimento de que a presença ou ausência do distúrbio no feto pode ser confirmada por testes. Muitos casais em risco de ter um filho com um grave distúrbio genético foram capazes de ter filhos saudáveis devido à disponibilidade do diagnóstico pré-natal.
4. Dar aos casais a opção de uma conduta apropriada para o iminente nascimento de uma criança com um distúrbio genético em termos de preparo psicológico, conduta na gestação/parto e cuidados pós-natais.
5. Possibilitar o tratamento pré-natal da criança afetada. Isto hoje é possível para um número muito pequeno, mas crescente, de distúrbios congênitos. Por exemplo, a grave obstrução da bexiga fetal pode ser detectada pelo ultra-som fetal. Se não for tratada, a conseqüente redução da produção de urina causará um grave oligoidrâmnio, e o pouco desenvolvimento pulmonar (síndrome de Potter) resultante. O alívio da obstrução da bexiga por procedimentos de desvio *in utero* pode evitar o dano irreversível aos pulmões em desenvolvimento e também pode melhorar as anomalias renais.

INDICAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

A indicação mais comum para o diagnóstico pré-natal é a idade materna avançada. Nos EUA e Europa ocidental, de acordo com os dados estatísticos para idade materna e nascimento em comparação com o número de diagnósticos pré-natais, pelo menos a metade de todas as mulheres grávidas com mais de 35 anos faz amniocentese. Nos EUA, os tribunais consideram um médico negligente se ele não oferecer o diagnóstico pré-natal a mulheres consideradas como tendo idade materna avançada.

A principal condição de risco para as gestantes com idade avançada é a síndrome de Down (Fig. 18.1). A despeito da ampla disponibilidade de diagnóstico pré-natal para mulheres com mais idade, a maioria dos fetos com síndrome de Down não é identificada pré-natalmente porque a maioria de tais gestações é em mães com menos de 35 anos de idade, que são, portanto, muito jovens para que sejam elegíveis para **amniocentese** ou **punção de vilosidades coriônicas** (CVS) de forma rotineira. Para mulheres com menos de 35 anos, novos testes não-invasivos podem ajudar a identificar uma grande proporção de fetos em risco. Tais testes "não-invasivos" incluem **triagem do soro materno** (MSS) juntamente com exame de ultra-sonografia para triar fetos com síndrome de Down, defeitos de tubo neural (NTDs) e outras anomalias. Estes testes serão descritos mais adiante.

O diagnóstico pré-natal não pode ser usado para excluir todas as anomalias fetais possíveis. Ele é limitado a determinar se o feto tem (ou talvez tenha) uma determinada condição para a qual um risco aumentado é indicado pela idade materna avançada, história familiar ou outros fatores de risco bem definidos. Se a amniocentese é feita por qualquer motivo, tanto o nível de alfafetoproteína (AFAFP) do líquido amniótico (discutido mais adiante) quanto o cariótipo são determinados para triar NTDs abertos e anomalias cromossômicas, respectivamente. Outros testes são feitos apenas para indicações específicas.

CONSULTA GENÉTICA PARA DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

Os pais que estão considerando um diagnóstico pré-natal precisam de informações que lhes permitam compreender sua situação e dar ou não seu consentimento para o procedimento. Além disso, a equipe profissional do programa de diagnóstico pré-natal (médico, enfermeira e geneticista) devem avaliar a situação, determinar o risco genético e verificar se outros problemas genéticos tam-

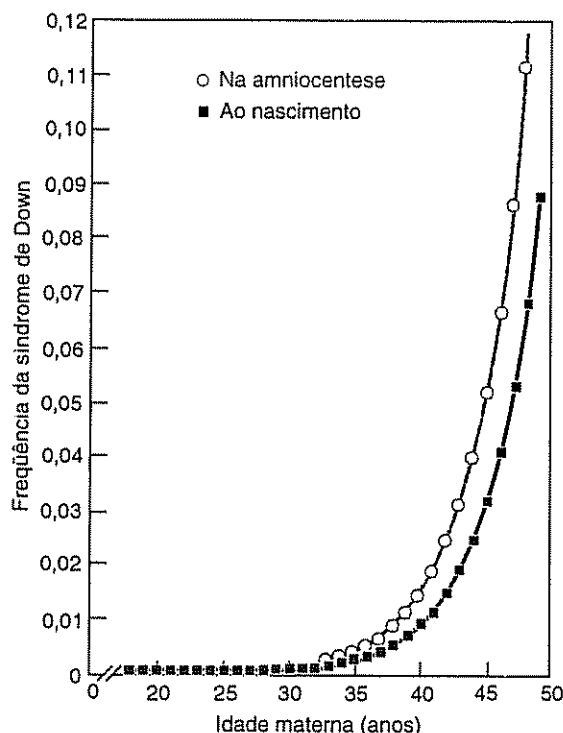



Fig. 18.1 Incidência de trissomia do 21 dependente da idade materna ao nascimento e na época da amniocentese Ver também Cap. 10 (Dados de Hook E B , Cross P K , Schreinemachers D M [1983] Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants JAMA 249:2034-2038)

bém devem ser considerados. A origem étnica ou a história familiar podem indicar a necessidade de testes de portador dos genitores antes do teste de diagnóstico pré-natal. Por exemplo, devemos considerar o risco de doença de Tay-Sachs no feto de um casal de judeus Ashkenazi encaminhado por qualquer motivo.

A consulta genética preliminar dos candidatos ao diagnóstico pré-natal em geral lida com o seguinte: (1) o risco de que o feto seja afetado; (2) a natureza e as prováveis conseqüências do problema específico; (3) os riscos e as limitações dos procedimentos a serem usados; (4) o tempo necessário antes que se tenha um relato e (5) a possível necessidade de repetir o procedimento no caso de falha da tentativa. Além disso, o casal deve ser alertado para o fato de que o resultado pode ser de difícil interpretação, que outros testes e consultas podem ser necessários, e que, mesmo assim, os resultados podem não ser necessariamente definitivos.

Finalmente, embora a grande maioria dos diagnósticos pré-natais termine em um bom resultado, as opções disponíveis aos pais no evento de uma anomalia, no qual o término da gestação é apenas uma, devem ser discutidas. *Acima de tudo, os pais devem entender que ao fazer um diagnóstico pré-natal eles não estão obrigados a terminar a gestação no caso de uma anomalia ser determinada.* O objetivo do diagnóstico pré-natal é determinar se a criança é afetada ou não pelo distúrbio em questão. O diagnóstico de uma criança afetada pode, pelo menos, permitir que os pais se preparem emocional e medicamente para lidar com um neonato que tem um distúrbio.

Várias doenças ainda não podem ser diagnosticadas na fase pré-natal, mas a cada mês distúrbios adicionais são acrescentados à lista de condições para as quais é possível o diagnóstico pré-natal (p. ex., ver Quadro 18.1). Manter-se em dia com as rápidas mudanças e servir como fonte central de informação sobre a atual situação dos testes pré-natais é uma das contribuições da genética clínica à prática médica em geral.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

Os métodos atualmente usados para diagnóstico pré-natal, tanto invasivos quanto não-invasivos, são mostrados no Quadro 18.2. Tanto a amniocentese quanto a CVS são procedimentos invasivos associados a um pequeno risco de perda fetal. Assim, o uso da amniocentese ou da CVS é indicado apenas para uma pequena porcentagem de grávidas, que atendem aos critérios de diagnóstico pré-natal já descritos. Em contraste, uma combinação de MSS ou triagem tripla (descrita mais adiante) e ultra-sonografia pode ser usada para avaliação fetal em gestações de baixo risco, bem como em *algumas* gestações de alto risco, pois ambas são não-invasivas e sem risco para o feto. A MSS pode ajudar a identificar fetos em risco aumentado de NTDs abertos, algumas anomalias cromossômicas, incluindo síndrome de Down, e outros distúrbios, como descrito neste capítulo.

As Principais Indicações para Diagnóstico Pré-natal por Testes Invasivos

As orientações em geral aceitas para a eligibilidade de grávidas para diagnóstico pré-natal por amniocentese ou CVS são baseadas na evidência de que o risco para uma anomalia fetal é pelo menos tão grande quanto o risco de aborto pelo próprio procedimento. Atualmente, mais de 200 distúrbios genéticos* podem ser diagnosticados na fase pré-natal usando-se amniocentese ou CVS. À medida que o escopo do diagnóstico pré-natal se ampliar e a tecnologia melhorar, as orientações certamente mudarão, mas, no momento, as principais indicações para diagnóstico pré-natal são as seguintes:

1. **Idade materna avançada.** A definição de idade materna avançada varia um pouco entre os centros de genética pré-natal, mas em geral é de pelo menos 35 anos ao engravidar. Esta idade foi selecionada porque aos 35 anos o risco de um feto com uma anomalia cromossômica é aproximadamente igual ao risco de aborto associado à amniocentese (ver Quadro 10.1 para riscos específicos de idade materna para um feto com uma anomalia cromossômica).
2. **Filho anterior com uma anomalia cromossômica *de novo*.** Embora os genitores de um filho com uma anomalia cromossômica possam ter cromossomos normais, em algumas situações ainda pode haver um risco aumentado de uma anomalia cromossômica em um filho subseqüente. Por exemplo, se uma mulher tem um filho com síndrome de Down aos 30 anos de idade, o risco de recorrência para *qualquer* anomalia cromossômica é de cerca de 1/100, em comparação ao risco populacional relacionado à idade de cerca de 1/390. O mosaicismo parental é uma explicação possível para o aumento de risco, mas na maioria dos casos o mecanismo de aumento do risco é desconhecido.

3. **Presença de anomalias cromossômicas estruturais em um dos genitores.** Aqui, o risco de uma anomalia cromossômica em uma criança varia dependendo do tipo de anomalia e, às vezes, do genitor de origem. O risco maior, 100% para a síndrome de Down, ocorre apenas se um dos genitores tiver uma translocação robertsoniana 21q21q ou um isocromossomo (ver Cap. 10).
4. **História familiar de um distúrbio genético que pode ser diagnosticado ou excluído por análise bioquímica ou de DNA.** A maioria dos distúrbios neste grupo é causada por defeitos monogênicos e, portanto, tem riscos de recorrência de 25% ou 50%. Os casos nos quais os genitores foram diagnosticados como sendo portadores após um teste de triagem populacional em vez de após o nascimento de um filho afetado também estão nesta categoria. Mesmo antes da análise de DNA tornar-se disponível, vários distúrbios bioquímicos podiam ser identificados na fase pré-natal, e a análise de DNA aumentou muito este número. O Quadro 18.1 fornece alguns exemplos de distúrbios monogênicos relativamente comuns para os quais o diagnóstico pré-natal pode ser feito pela análise de DNA (seja por análise de mutação ou análise de ligação).
5. **História familiar de um distúrbio ligado ao X para o qual não há teste diagnóstico pré-natal específico.** Quando não há método alternativo, os genitores de um menino afetado com um distúrbio ligado ao X podem usar a determinação do sexo fetal para ajudá-los a decidir se continuam ou interrompem uma gestação subseqüente devido ao risco de recorrência, que pode ser de até 25%. Para distúrbios ligados ao X, tais como a distrofia muscular Duchenne e as hemofilias A e B, entretanto, nos quais o diagnóstico pré-natal pela análise de DNA está disponível, primeiro é determinado o sexo fetal e depois é feita a análise de DNA, se o feto for masculino. Em ambas as situações mencionadas, o diagnóstico genético pré-implantação (ver discussão posterior) pode ser uma opção para permitir a transferência para o útero apenas dos embriões determinados como não sendo afetados pelo distúrbio em questão.
6. **Risco de um defeito de tubo neural.** Os parentes em primeiro grau (e parentes em segundo grau em alguns centros) de pacientes com NTD são elegíveis para amniocentese em função de um aumento de risco de ter um filho com um NTD (ver Quadro 15.8). Muitos NTDs abertos hoje podem ser detectados por outros testes não-invasivos, entretanto, como descrito mais adiante.
7. **Triagem do soro materno e ultra-som.** A avaliação genética e os testes posteriores são recomendados quando as anomalias fetais são detectadas por triagem rotineira de gestações de baixo risco por MSS ou ultra-som fetal (ver mais adiante).

*O número de aproximadamente 200 distúrbios é derivado dos listados no web site Genetests (*http://www.genetests.org*) e não inclui testes que podem estar disponíveis em outros laboratórios.

A ultra-sonografia, além de sua função na avaliação da idade gestacional e do crescimento fetal, permite o diagnóstico de várias anomalias morfológicas, muitas das quais são de origem genética, em idades gestacionais iniciais (ver mais adiante).

Testes Invasivos

AMNIOCENTESE

Amniocentese refere-se ao procedimento de remover uma amostra de líquido amniótico transabdominalmente com uma seringa (Fig. 18.2*A*). O líquido amniótico contém células de origem fetal que podem ser cultivadas para testes diagnósticos. Antes da amniocentese, a varredura ultra-sonográfica era rotineiramente usada para confirmar a viabilidade fetal, a idade gestacional (medindo o diâmetro biparietal fetal e o tamanho femural), o número de fetos, a normalidade estrutural e a posição ideal para a inserção da agulha pelo estabelecimento da posição do feto e da placenta. A amniocentese é feita sem que a paciente fique internada, tipicamente entre a 15.ª e a 16.ª semana após o primeiro dia do último período menstrual. Entretanto, o procedimento tem sido feito em um estágio mais precoce na gestação, até mesmo entre a 10.ª e a 14.ª semana em alguns centros.

Além da análise cromossômica fetal, a concentração de AFP pode ser dosada no líquido amniótico para detectar NTDs abertos. A AFP é uma glicoproteína fetal produzida principalmente no fígado, secretada na circulação fetal e excretada pelos rins no líquido amniótico via urina fetal. A AFP entra na corrente sangüínea materna via placenta, membranas amnióticas e circulação maternofetal. Ela pode, portanto, ser dosada tanto no líquido amniótico (AFAFP) quanto no soro materno (MSAFP). Ambas as dosagens são extremamente úteis no diagnóstico pré-natal, principalmente para avaliar o risco de um NTD aberto, mas também por outros motivos (ver discussão mais adiante).

QUADRO 18–1

Distúrbios Monogênicos Comuns Selecionados para os Quais o Diagnóstico Pré-natal por Análise de DNA É Possível em Muitas Famílias

Distúrbio	Herança
Acondroplasia	AD
Doença do rim policístico autossômica dominante	AD
Doença de Huntington	AD
Distrofia miotônica	AD
Neurofibromatose, tipo I	AD
Retinoblastoma	AD
Fibrose cística	AR
Hiperplasia adrenal congênita	AR
Ataxia de Friedreich	AR
Fenilcetonúria	AR
Anemia falciforme	AR
Atrofia de músculo espinhal	AR
Doença de Tay-Sachs	AR
Talassemias α e β	AR
Distrofia muscular de Duchenne e Becker	Ligada ao X
Síndrome do X frágil	Ligada ao X
Hemofilia A e B	Ligada ao X
Deficiência de ornitina transcarbamilase	Ligada ao X

AR = autossômica recessiva; AD = autossômica dominante.

QUADRO 18-2

Métodos de Diagnóstico Pré-natal

Testes Invasivos
Amniocentese
Punção de vilosidades coriônicas
Cordocentese
Diagnóstico genético pré-implantação

Testes Não-invasivos
Alfa-fetoproteína do soro materno
Triagem de soro materno
Ultra-sonografia
Isolamento de células fetais da circulação materna

A concentração de AFP é dosada por imunoensaio, um método relativamente simples e barato que pode ser aplicado a todas as amostras de líquido amniótico, independente da indicação específica para a amniocentese. Quando é usada a dosagem de AFAFP em conjunto com a varredura ultra-sonográfica entre a 18.ª e a 19.ª semana de gestação, cerca de 99% dos fetos com espinha bífida aberta e absolutamente todos os fetos com anencefalia podem ser identificados. Para interpretar estes achados, a faixa normal deve ser estabelecida em relação à idade gestacional e outros fatores, além de um NTD aberto, que podem aumentar o nível de AFAFP. Os fatores que potencialmente levam a concentrações anormalmente altas de AFP no líquido amniótico incluem os seguintes:

1. Subestimativa da idade gestacional. A concentração de AFP é mais alta entre a 12.ª e a 14.ª semana de gestação que na 16.ª semana, quando mais freqüentemente é feita a amniocentese.
2. Contaminação de sangue fetal.
3. Morte fetal.
4. Gestação de gêmeos.
5. Anomalias fetais, incluindo onfalocele e pelo menos uma forma de nefrose congênita, bem como outros problemas raros.
6. Outra variação inexplicada na concentração normal de AFP no líquido amniótico.

Algumas destas causas de um nível elevado de AFAFP podem ser identificadas por exame ultra-sonográfico.

A principal complicação associada à amniocentese de meio trimestre é um risco de 0,5% a 1% de induzir aborto acima do risco básico de aproximadamente 2% a 3% de qualquer gestação neste estágio. Outras complicações são raras, incluindo vazamento de líquido amniótico, infecção e dano ao feto pela punção da agulha. Como já foi mencionado antes, a amniocentese pode ser feita entre a 10.ª e a 14.ª semana. Um estudo aleatório que comparou a segurança e o resultado fetal da amniocentese realizada mais cedo *versus* a amniocentese de meio trimestre demonstrou um risco aumentado de aborto espontâneo de 2,6% no grupo mais precoce *versus* 0,8% no grupo de meio trimestre. A única anomalia congênita encontrada como estando aumentada na amniocentese realizada mais cedo é o *talipes equinovarus* (pé torto), com uma incidência de 1,3% *versus* o risco da população em geral de 0,1% a 0,3% (um risco que não está aumentado na amniocentese de meio trimestre). Para evitar a imunização de Rh da mãe (ver Cap. 14), a administração de imunoglobulina Rh é rotineira para as mulheres Rh negativo após qualquer procedimento invasivo (incluindo a amniocentese e os dois procedimentos descritos nas seções que se seguem, CVS e cordocentese).

Punção de Vilosidade Coriônica

Desenvolvimento Embrionário e Vilosidades Coriônicas. Uma breve revisão do desenvolvimento inicial das vilosidades coriônicas ajuda a esclarecer a base da técnica da CVS (Fig. 18.3). As vilosidades são derivadas do trofoblasto, a parte extra-embrionária do blastocisto. Durante a implantação, o trofoblasto diferencia-se em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto. O sinciciotrofoblasto invade a parede uterina e eventualmente forma lacunas, nas quais o sangue materno se acumula. Ao

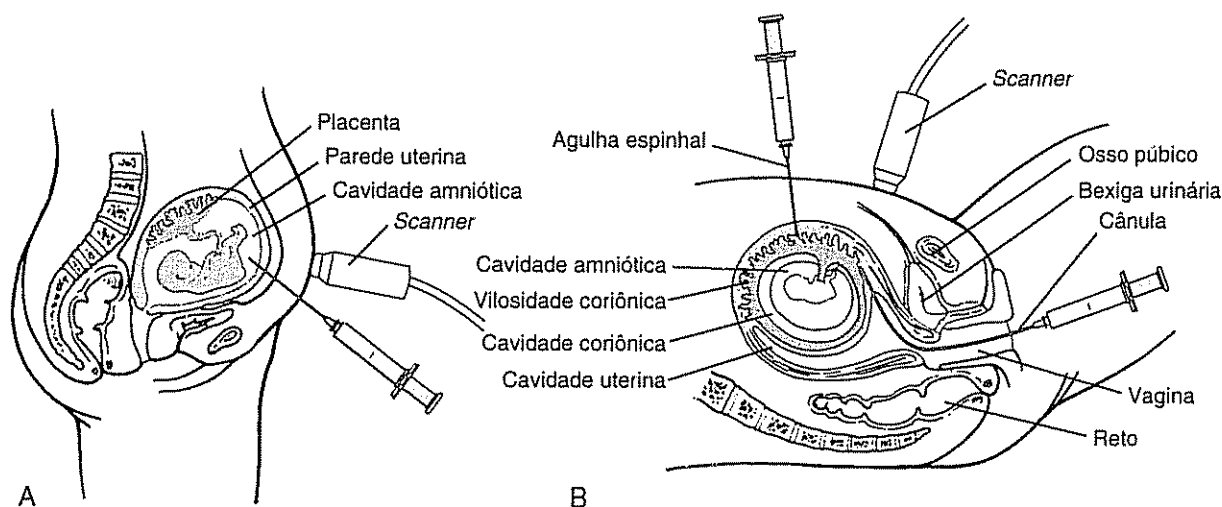



Fig. 18.2 *A*, Amniocentese. Uma agulha é inserida transabdominalmente na cavidade amniótica, e uma amostra do líquido amniótico (em geral cerca de 20 ml) é colhida com uma seringa para estudos diagnósticos (p. ex., estudos cromossômicos, dosagens enzimáticas ou análise de DNA). A ultra-sonografia é feita rotineiramente antes ou durante o procedimento. *B*, Punção de vilosidade coriônica. Dois enfoques alternativos de coleta: transcervical (por meio de uma cânula flexível) e transabdominal (com uma agulha espinhal). Em ambos os enfoques, o sucesso e a segurança dependem do uso de imagens de ultra-som (*scanner*). (De Moore K. L. e Persaud T. V. N. [1998] The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 6.ª ed. WB Saunders, Philadelphia.)

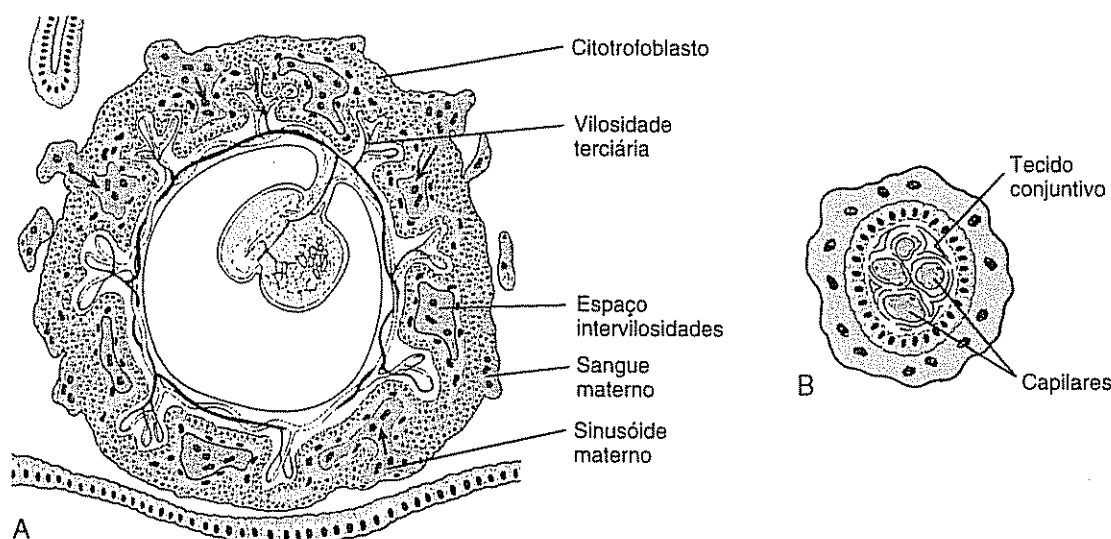



Fig. 18.3 Desenvolvimento das vilosidades coriônicas terciárias e placenta *A*, Corte diagramático de um embrião implantado e placenta com cerca de 21 dias. *B*, Corte de uma vilosidade terciária mostrando o estabelecimento da circulação no cerne mesenquimal, citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto (De Moore K L [1988] The Developing Human: Clinically Oriented Embriology, 4.ª ed WB Saunders, Philadelphia)

final da segunda semana, as **vilosidades coriônicas primárias** são formadas como proliferações do citotrofoblasto que se projetam no sinciciotrofoblasto. As vilosidades logo começam a se ramificar, e o mesênquima cresce nelas para formar um cerne. A formação de um cerne caracteriza as **vilosidades secundárias**. As redes de capilares desenvolvem-se no cerne mesenquimal, e a circulação é estabelecida. As vilosidades são então **vilosidades terciárias**. As vilosidades terciárias ramificam-se muito e, ao final da oitava semana, cobrem toda a superfície do saco coriônico como o ***chorion frondosum***. Parte do córion subseqüentemente se torna o **córion liso** (***chorion laeve***), à medida que as vilosidades nesta área degeneram. As vilosidades que são colhidas para diagnóstico pré-natal são as vilosidades terciárias do *chorion frondosum* e são compostas de um cerne mesenquimal, de citotrofoblasto e de uma camada externa de sinciciotrofoblasto.

Vantagens e Riscos da Coleta de Vilosidades Coriônicas. A CVS envolve a biópsia de tecido da área vilosa do córion transcervical ou transabdominalmente, em geral entre a 10.ª e a 12.ª semana de gestação (ver Fig. 18.2*B*). A principal vantagem da CVS comparada com a amniocentese de meio trimestre é que a CVS permite que os resultados estejam disponíveis em um estágio mais inicial da gestação, reduzindo, assim, o período de incerteza e permitindo que o término, se escolhido, seja feito no primeiro trimestre e sem que a paciente seja internada. Entretanto, a AFP não pode ser dosada neste estágio (em contraste com as 15 a 16 semanas em que é feita a amniocentese), e a triagem para NTDs abertos deve ser feita por MSS com aproximadamente 16 semanas de gestação. Como na amniocentese, o ultra-som é usado antes da CVS para determinar o melhor enfoque para a coleta. O aumento na taxa de perda fetal decorrente da CVS é de cerca de 1%, adicional ao risco básico de 2% a 5% após 7 a 12 semanas de gestação. O sucesso da análise cromossômica é o mesmo que aquele visto na amniocentese (mais de 99%). Entretanto, cerca de 2% das coletas CVS levam a resultados ambíguos devidos a mosaicismo cromossômico (incluindo verdadeiro e pseudomosaicismo, ver adiante). Nestas situações, é recomendado o acompanhamento com amniocentese para estabelecer se o feto tem uma anomalia cromossômica.

Cordocentese

A cordocentese é um procedimento usado para obter uma amostra de sangue fetal diretamente do cordão umbilical com orientação ultra-sonográfica. A amostra de sangue fetal precisa de apenas alguns dias em cultura para se ter células adequadas para a análise cromossômica ou estudos hematológicos. A cordocentese é usada para acompanhar um exame ultra-sonográfico que mostrou alguma anomalia fetal, quando a cultura de células amnióticas falhou ou produziu resultados ambíguos ou quando o diagnóstico por DNA não é possível para um distúrbio que possa ser identificado por testes bioquímicos do plasma fetal ou células do sangue. A cordocentese em geral é feita entre a 19.ª e a 21.ª semana de gestação, e a incidência de perda fetal em decorrência do procedimento é de aproximadamente 2% a 3%.

Teste Não-invasivo

Triagem do Soro Materno para Dosagem de Alfa-fetoproteína na 16.ª Semana

Quando o feto tem um NTD aberto, a concentração de AFP é mais alta que o normal no soro materno, bem como no líquido amniótico. Esta observação é a base para o uso de dosagem de MSAFP na 16.ª semana como um teste para os NTDs abertos. Como cerca de 95% das crianças com NTDs nascem em famílias sem história conhecida destas malformações, um teste relativamente simples que pode ser seguido por testes mais específicos constitui um instrumento de triagem importante. Como mostra a Fig. 18.4, há uma superposição considerável entre a faixa normal para MSAFP e a faixa de concentração encontrada quando o feto tem um NTD aberto. Se uma concentração elevada é definida como dois múltiplos da média, podemos estimar que 20% dos fetos com NTDs permanecem não-detectados.

Uso Combinado de Triagem do Soro Materno para Alfa-fetoproteína e Ultra-som. O uso combinado de dosagem de MSAFP com uma detalhada ultra-sonografia diagnóstica (ver discussão posterior) é próximo, em termos de precisão, de AFAFP e ultra-som para a detecção de NTDs abertos. Como a dosagem de MSAFP não é invasiva, sua medida, juntamente com a ultra-sonografia, é preferida para diagnóstico de NTDs abertos em muitos centros. Assim, em muitos programas de diagnóstico pré-natal, os parentes em primeiro grau, segundo grau ou mais remotos de pacientes com NTDs podem ter uma dosagem de MSAFP (em 16 semanas) seguida de ultra-som detalhado (em 18 semanas).

A suplementação periconcepcional com ácido fólico (pelo menos 1 mês antes da concepção e continuada durante o primeiro trimestre de gestação) tem demonstrado que diminui a incidência de NTDs em quase 75% (ver Cap. 15). Reduções na incidência de outros defeitos de nascimento também têm sido demonstradas. Todas as mulheres grávidas devem receber esta informação. A dosagem recomendada de ácido fólico aumenta com o risco estimado de NTD (uma dose maior é dada a mulheres com risco aumentado com base em uma história familiar positiva).

Triagem do Soro Materno (Triagem Tripla)

A MSS, às vezes chamada de triagem tripla, dosa três marcadores sanguíneos e está disponível para a maioria das mulheres grávidas entre 15 e 20 semanas de gestação para identificar as que têm risco aumentado de síndrome de Down, trissomia do 18 e NTD (neste último dosando especificamente AFP, como já discutido).

	AFP	uE3	HCG
Risco aumentado de síndrome de Down	↓	↓	↑
Trissomia do 18	↓	↓	↓
NTD	↑	não-aplicável	não-aplicável

Os três componentes do soro dosados neste teste de triagem incluem AFP, estriol não-conjugado (uE3) e gonadotrofina coriônica humana (HCG). Nas gestações com síndrome de Down, os níveis de AFP e uE3 estão *reduzidos* no soro materno, com valores médios de cerca de 0,72 e 0,73 múltiplos da média, respectivamente, em comparação aos controles. (Por definição, o controle múltiplo da média é 1,0). A concentração de uE3 também é reduzida nas mulheres que são fumantes e, em geral, nos casos de imaturidade do feto. Os níveis extremamente baixos podem indicar deficiência de esteróide sulfatase ou síndrome de Smith-Lemli-Opitz. A HCG no soro materno está significativamente mais *alta* que o normal quando o feto tem síndrome de Down, com um valor médio de dois múltiplos da média. A triagem usando apenas a idade materna detecta cerca de 30% das gestações com síndrome de Down, enquanto dosando-se todos os três marcadores bioquímicos e também se considerando a idade materna a detecção de gestações com síndrome de Down é aumentada para aproximadamente 60%.

Quando o nível de todos esses três marcadores bioquímicos é baixo, o risco de trissomia do 18 está significativamente aumentado. De fato, a taxa de detecção da trissomia do 18 é tida como sendo maior que 80%. Outros marcadores de segundo trimestre estão sendo investigados para acentuar esta forma de triagem. Além disso, vários estudos estão sendo feitos para identificar e avaliar o uso de marcadores bioquímicos, incluindo β-HCG livre e proteína placentária associada à gestação (PAPP-A), para a previsão de síndrome de Down e trissomia do 18 no primeiro trimestre de gestação.

É crucial que as mulheres e seus parceiros sejam informados de que a MSS, seja no primeiro ou segundo trimestre, é apenas um teste de *triagem* e não um instrumento diagnóstico. Um teste de MSS é considerado como "triagem positiva" para a síndrome de Down uma vez que o ultra-som tenha confirmado a idade fetal e que o risco estimado seja equivalente ou maior que o risco para uma mulher de 35 anos. Outras informações e testes diagnósticos (p. ex., amniocentese) devem ser oferecidos a mulheres cujo teste de triagem MSS deu positivo. As mulheres cujo resultado do teste de triagem MSS é considerado "negativo" devem estar cientes de que seu risco de ter um filho com síndrome de Down, trissomia do 18 ou um NTD, embora muito reduzido, não é zero (o resultado é apenas uma estimativa de risco).

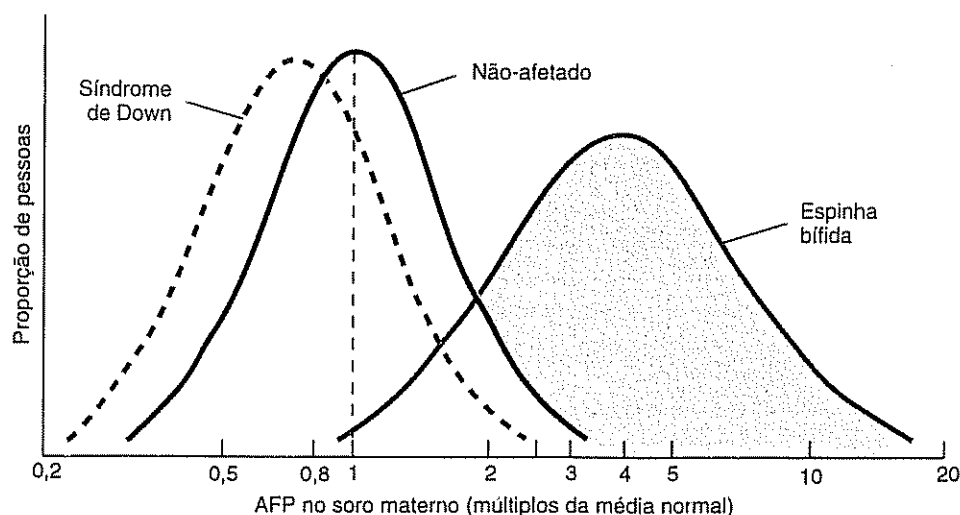



Fig. 18 4 Concentração materna de alfa-fetoproteína (AFP), expressa como múltiplos da média, em fetos normais, fetos com defeitos de tubo neural aberto e fetos com síndrome de Down. (Redesenhado de Wald N J, Cuckle H S (1987) Recent advances in screening for neural tube defects and Down syndrome. In Rodeck C (ed) Prenatal Diagnosis. Baillière Tindall, London, pp 649-676.)

Em muitas clínicas, a MSS já se tornou um teste padrão oferecido a todas as mulheres grávidas; assim, este teste está mais relacionado às preocupações diárias do clínico geral do que às anomalias raras ou mesmo às condições genéticas comuns que constituem o tema da genética médica. Os profissionais de cuidados de saúde devem estar cientes das limitações e dos benefícios da MSS e devem conhecer o procedimento correto no evento de um teste de triagem positivo.

ULTRA-SONOGRAFIA

A triagem de alta resolução é cada vez mais importante no diagnóstico pré-natal para a avaliação fetal e para a detecção de anomalias morfológicas (Fig. 18.5). Ela permite a determinação precisa da idade fetal, identifica gestações múltiplas e verifica a viabilidade fetal. Pode ser usada ainda no segundo trimestre para identificar o sexo fetal com alto grau de precisão. O ultra-som transabdominal, o método tradicional, hoje é suplementado com aumento de freqüência pelo ultra-som transvaginal para avaliar a viabilidade fetal e a idade gestacional e, no primeiro trimestre, para detectar vários tipos importantes de anomalias, tais como anencefalia e higroma cístico (Quadro 18.3). Assim, muitas malformações são hoje detectáveis em primeiro lugar pela ultra-sonografia de rotina, mesmo sem uma história familiar que indique um risco aumentado. A avaliação do acompanhamento a longo prazo falhou em dar uma evidência de que a ultra-sonografia seja prejudicial para o feto ou para a mãe.

Ultra-som Pré-natal para Aneuploidia Cromossômica. Várias anomalias fetais que podem ser detectadas por ultra-som estão associadas a aneuploidias cromossômicas. O Quadro 18.4 mostra a prevalência de defeitos cromossômicos fetais nos fetos com anomalias selecionadas isoladas e com anomalias múltiplas detectadas por ultra-som. Um exemplo de um marcador útil de ultra-som para avaliar o risco de aneuploidia fetal é a dosagem da translucência nucal fetal (NT), que quantifica a translucência subcutânea entre a pele e o tecido mole que recobre a coluna cervical. A NT pode estar aumentada devido a um acúmulo anormal de líquido na parte posterior do pescoço fetal no primeiro trimestre (10 a 14 semanas). O risco de aneuploidia, que varia com a idade materna e a idade gestacional, também depende do grau de NT. A triagem para aumento de NT requer operadores altamente habilitados, pois a colocação do compasso de calibre pode resultar em uma variação significativa na medida. Este tes-

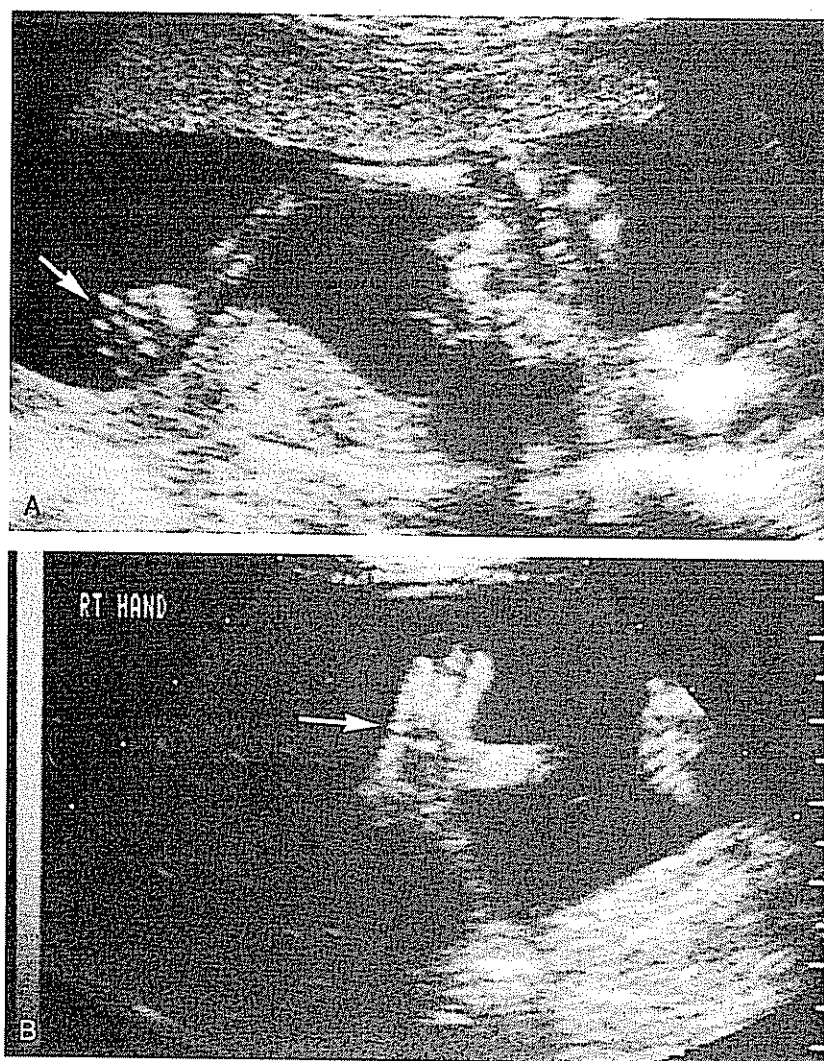



Fig. 18.5 Ultra-sonografias das mãos (*setas*) de feto normal (*A*) e feto com síndrome de Holt-Oram (*B*), um defeito autossômico dominante com anomalias variáveis cardíacas e dos membros. A imagem da mão (*B*) mostra que só existem três dedos óbvios e um polegar. O polegar é anormal em forma (grande e espesso), bem como em posição. (Fotos por cortesia de A. Toi, Toronto General Hospital.)

QUADRO 18-3

Exemplos de Defeitos que Podem Ser Diagnosticados ou Excluídos por Ultra-som Diagnóstico Pré-natal

Distúrbios Monogênicos
Holoprosencefalia
Doença infantil do rim policístico
Síndrome de Meckel-Gruber (um distúrbio autossômico recessivo com encefalocele, polidactilia e rins policísticos)
Síndrome de Fryns (um distúrbio autossômico recessivo, em geral letal perinatalmente, com anomalias da face, do diafragma, dos membros, das vias geniturinárias e do sistema nervoso central)

Distúrbios em Geral Tidos como Multifatoriais
Fenda labial
Pé torto
Defeitos cardíacos congênitos
Defeitos de tubo neural

Anomalias que Podem Indicar uma Síndrome
Genitália anormal
Higroma cístico
Polidactilia
Onfalocele
Defeitos de raio radial

QUADRO 18-4

Prevalência de Defeitos Cromossômicos Fetais com Anomalias Isoladas e Múltiplas Detectadas Ultra-sonograficamente*

	Defeitos Cromossômicos (%)	
Anomalia	*Achado Isolado*	*Achados Múltiplos*
Ventriculomegalia	2	17
Cistos no plexo coróide	1	48
Higroma cístico	52	71
Edema nucal	19	45
Hérnia diafragmática	2	49
Defeitos cardíacos	16	66
Atresia duodenal	38	64
Exonfalia	8	46
Anomalias renais	3	24

*Estas anomalias comuns em ultra-som estão mais tipicamente associadas à trissomia do 21, trissomia do 18, trissomia do 13 ou 45,X, mas podem estar associadas a qualquer anomalia cromossômica. Adaptado de Snijders R. J. M., Nicolaides K. H (1996) Ultrasound Markers for Fetal Chromosomal Defects. The Parthenon Publishing Group, New York

te de triagem detecta até 80% das gestações com síndrome de Down. Além da aneuploidia cromossômica, o aumento de NT também pode indicar um defeito cardíaco subjacente ou síndrome genética. Quando a possibilidade de um defeito cromossômico está aumentada, ela pode ser confirmada ou excluída pela análise cromossômica fetal. A determinação do cariótipo fetal é importante para a tomada de decisão sobre a continuidade da gestação, o acompanhamento da gestação e o parto, se a gestação for continuada, e para a consulta genética com relação às futuras gestações.

Ultra-som Pré-natal para Distúrbios Monogênicos. Quando um feto está em risco de um distúrbio monogênico para o qual a lesão genética exata não é conhecida, a ultra-sonografia detalhada às vezes pode ser o único método possível de diagnóstico pré-natal. Por exemplo, o diagnóstico pré-natal da síndrome de Meckel-Gruber (ver Quadro 18.3) no momento só pode ser feito por ultra-som. Embora a detecção de uma anomalia estrutural específica (p. ex., encefalocele) indique a recorrência desta síndrome, a ausência de anomalias detectáveis não exclui inteiramente o distúrbio, pois as anomalias estruturais podem ser perdidas em função da variabilidade na apresentação clínica ou das limitações do procedimento. Uma vez identificados os genes associados a este distúrbio, os testes específicos de DNA substituirão a ultra-sonografia no diagnóstico pré-natal desta condição.

Em alguns casos para os quais o teste de DNA é possível, mas uma amostra de sangue ou tecido não está disponível para estudos de DNA ou proteína, a ultra-sonografia diagnóstica pode ser apropriada, mesmo se o risco de recorrência for baixo. Por exemplo, uma mulher pode se apresentar com 16 semanas de gestação dizendo que sua gestação anterior resultou em um natimorto com características altamente sugestivas do grave distúrbio ósseo osteogênese imperfeita, tipo II (ver Cap. 12). Nenhuma autópsia foi feita e não existem amostras de tecido disponíveis deste natimorto. A osteogênese imperfeita, tipo II, geralmente se deve a uma nova mutação dominante, com um risco empírico de recorrência de 6% devido a mosaicismo na linhagem germinativa. Em aproximadamente 5% das famílias, entretanto, a condição pode ser herdada de modo autossômico recessivo. Considerando que há um risco de recorrência aumentado do distúrbio para a atual gestação desta mulher, é indicada a ultra-sonografia diagnóstica. O achado de um feto normal seria tranqüilizador, enquanto a identificação de um feto com múltiplas fraturas orientaria a conduta do restante da gestação. Também se deve observar que alguns laboratórios podem estar preparados para fazer testes de colágeno em tais situações se o casal optar por fazer um teste mais cedo, embora invasivo.

Ultra-som Pré-natal para Distúrbios Multifatoriais. Várias anomalias isoladas que podem recorrer em famílias e que são tidas como tendo herança multifatorial também podem ser identificadas por ultra-sonografia (ver Quadro 18.3), incluindo malformações de tubo neural (Fig. 18.6). A ecocardiografia fetal é oferecida em um número crescente de centros para uma avaliação detalhada de gestações de risco para um defeito cardíaco congênito (Quadro 18.5).

Determinação do Sexo Fetal. O ultra-som pode ser usado a partir da 15ª semana de gestação para determinar o sexo fetal. Esta determinação pode ser um prelúdio ou auxiliar importante no diagnóstico pré-natal de distúrbios ligados ao X (p. ex., hemofilia) para mulheres identificadas como tendo um risco aumentado. Um casal pode decidir não fazer um teste invasivo se um feto feminino (e, portanto, não-afetado) for identificado por ultra-som.

O equipamento e as técnicas usadas na ultra-sonografia permitem hoje a detecção de muitas malformações pela ultra-sonografia rotineira. Uma vez que se detecte ou se suspeite de uma malformação no ultra-som de rotina deve-se organizar um estudo detalhado para melhor avaliação. Além disso, uma consulta com um geneticista clínico de uma unidade perinatal deve ser iniciada para informações e outras investigações. O achado de um feto normal pode ser cautelosamente tranqüilizador, en-

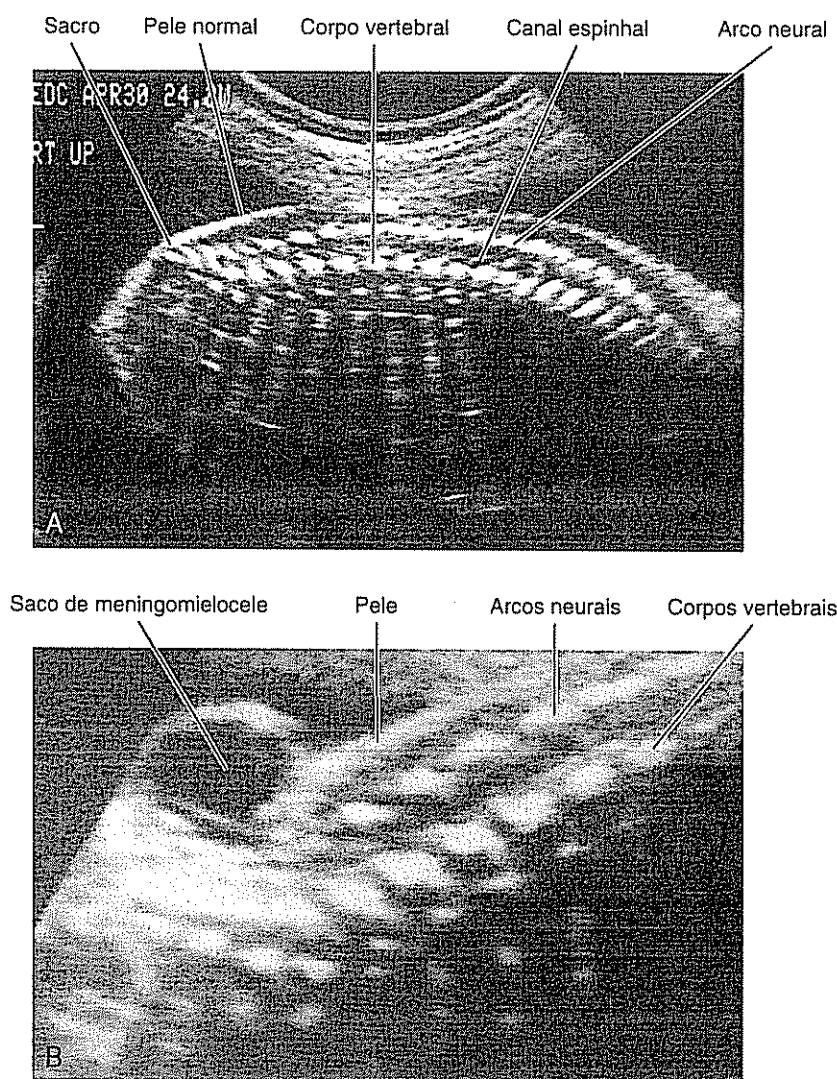



Fig. 18.6 Ultra-sonografias do canal espinhal e tubo neural de um feto normal com 24 semanas de gestação (*A*) e um feto com defeito de tubo neural (*B*) A imagem em *A* é uma visão longitudinal da linha média, com o sacro à esquerda e a coluna torácica à direita Notar as duas fileiras paralelas de eco branco que representam os arcos neurais Também são mostrados os ecos dos corpos vertebrais e a pele intata de revestimento A figura *B* mostra claramente o saco de meningomielocele em protrusão na pele Compare com a Fig 15 7 (Fotos por cortesia de A Toi, Toronto General Hospital)

quanto a identificação de um feto com uma anomalia permite ao casal optar ou por uma gravidez apropriada e conduta de parto ou pelo término da gestação

TECNOLOGIAS EMERGENTES PARA DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL

Diagnóstico Genético Pré-implantação

O diagnóstico genético pré-implantação é o uso de técnicas moleculares ou citogenéticas durante a **fertilização *in vitro*** (IVF) para selecionar embriões livres de uma condição genética específica para transferir para o útero. Esta tecnologia foi desenvolvida em um esforço para oferecer uma alternativa aos casais que se opõem ao término da gestação e têm um risco significativo de um distúrbio genético específico ou aneuploidia em sua prole. O diagnóstico genético pré-implantação pode ser feito usando-se técnicas de micromanipulação para remover um glóbulo polar (ver Cap. 2) ou por biópsia de uma única célula de um blastômero com 6 a 8 células após IVF. A análise molecular usando a reação em cadeia da polimerase foi feita para vários distúrbios monogênicos e parece dar resultados precisos. Anomalias cromossômicas têm sido recentemente diagnosticadas usando-se hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) (ver Caps 4 e 9). A transferência de embriões não-afetados é então feita após a análise molecular ou cromossômica estabelecer que o blastômero não leva a anomalia genética em questão. Os poucos dados atualmente disponíveis acerca desta tecnologia sugerem que não há efeitos detrimentais para os embriões que sofreram a biópsia. Os embriões afetados são descartados, embora esta última prática tenha levantado questionamentos éticos.

Células Fetais no Sangue Materno

Desde 1969 sabe-se que a circulação materna contém células fetais em quantidade muito pequena. Esta descoberta levou à

QUADRO 18-5

Alguns Exemplos de Indicações para Ecocardiografia Fetal*

Indicações Maternas (% de risco de defeito cardíaco congênito)
Doença materna
diabetes melito insulino-dependente (3% a 5%)
fenilcetonúria (15%)
Exposição a teratógeno
talidomida (10% se 20 a 30 dias após a concepção)
fenitoína (2% a 3%)
álcool (25% com síndrome do álcool fetal)
Doença cardíaca materna (5% a 10% de risco para a maioria das lesões)
Triagem tripla materna anormal

Indicações Fetais
Ultra-som fetal geral anormal
Arritmia
Anomalias cromossômicas
Espessamento nucal
Hidropisia fetal não-imune

Indicações Familiares
Síndromes mendelianas (p. ex., esclerose tuberosa, síndrome de Noonan, síndrome velocardiofacial, síndrome de Holt-Oram, síndrome de Williams)
Doença cardíaca paterna (2% a 5%)
Filho anterior afetado (2% a 4%, maior para algumas lesões)

*Essa lista não é abrangente e as indicações variam de acordo com os centros

percepção de que o isolamento de células fetais do sangue materno podia ser usado como um meio não-invasivo de fazer um diagnóstico pré-natal de alguns distúrbios monogênicos, bem como a análise cromossômica. Vários tipos de células fetais podem ser separados do sangue materno por uma variedade de técnicas e então selecionados usando anticorpos monoclonais. As células fetais enriquecidas podem ser usadas para análise cromossômica, determinação do sexo e diagnóstico molecular de distúrbios monogênicos. Esta tecnologia ainda está em um estágio inicial de desenvolvimento, e muitas perguntas importantes devem ser respondidas antes que este enfoque possa ser amplamente aplicado. Um dos principais aspectos científicos que devem ser abordados é a identificação do tipo de célula fetal ideal para estudo. Embora os linfócitos fetais possam persistir por muitos anos no sangue materno, os eritrócitos nucleados e trofoblastos jovens demonstraram não persistir. A persistência dos linfócitos fetais na circulação materna pode confundir o uso da amostragem de células fetais em gestações subseqüentes. Outros aspectos incluem a época mais apropriada da gestação para amostragem de sangue materno quanto às células fetais e a determinação da fração de células fetais nestas amostras. Demonstrou-se que há um aumento de células fetais na circulação materna em muitos casos de aneuploidia, especialmente na trissomia do 21, o que pode levar a uma melhor detecção de tais gestações.

ESTUDOS LABORATORIAIS

Citogenética no Diagnóstico Pré-natal

Tanto a amniocentese quanto a CVS podem fornecer células fetais para cariotipagem, bem como para análise bioquímica ou de DNA. A preparação e a análise dos cromossomos de culturas de células de líquido amniótico ou culturas de vilosidades coriônicas requer de 1 a 2 semanas. As vilosidades coriônicas podem ser usadas para cariotipagem após incubação a curto prazo ou culturas de longo prazo. A incubação a curto prazo, embora forneça resultados mais depressa, produz preparações de qualidade relativamente pobre, nas quais a resolução do bandeamento é inadequada para uma análise detalhada. A maioria dos laboratórios usa ambas as técnicas, mas se apenas uma é usada, no momento a técnica de escolha é a cultura a longo prazo de células do cerne mesenquimal.

A FISH (ver Caps. 4 e 9) possibilita triar núcleos interfásicos em células fetais para as aneuploidias comuns dos cromossomos 13, 18, 21, X e Y imediatamente após a amniocentese ou CVS. Este enfoque para uma rápida avaliação citogenética pré-natal ainda está sendo avaliada como um instrumento diagnóstico.

ANÁLISE CROMOSSÔMICA APÓS ULTRA-SONOGRAFIA

Como alguns defeitos de nascimento detectáveis por ultra-sonografia estão associados a anomalias cromossômicas, a cariotipagem de células do líquido amniótico, células de vilosidades coriônicas ou células do sangue fetal obtidas por cordocentese podem ser indicadas após a detecção ultra-sonográfica de tais anomalias. As anomalias cromossômicas são encontradas com mais freqüência quando são detectadas múltiplas malformações em vez de malformações isoladas (ver Quadro 18.4). Os cariótipos vistos com mais freqüência em fetos avaliados por achados ultra-sonográficos anormais são as trissomias autossômicas comuns (21, 18 e 13), 45,X (síndrome de Turner) e anomalias estruturais não-balanceadas. A presença de um higroma cístico pode indicar um cariótipo 45,X, mas também pode ocorrer na síndrome de Down e na trissomia do 18, bem como em fetos com cariótipos normais. Assim, é indicada a análise cromossômica completa.

PROBLEMAS NA ANÁLISE CROMOSSÔMICA PRÉ-NATAL

Mosaicismo. O mosaicismo refere-se à presença de duas ou mais linhagens celulares em uma pessoa ou amostra de tecido. Quando o mosaicismo é encontrado em culturas de células fetais, existem muitos problemas na interpretação, quanto a se o feto é verdadeiramente um mosaico e quanto ao significado clínico da observação.

Os citogeneticistas distinguem três níveis de mosaicismo nas culturas de células do líquido amniótico ou CVS:

(1) **Mosaicismo verdadeiro** — detectado em várias colônias de culturas primárias diferentes. Os estudos pós-natais confirmaram que o mosaicismo verdadeiro na cultura está associado ao alto risco de que o mosaicismo esteja de fato presente no feto. A probabilidade varia com situações diferentes. O mosaicismo para anomalias estruturais de cromossomos, por exemplo, dificilmente é confirmado.
(2) **Pseudomosaicismo** — uma única célula incomum, que geralmente pode ser desconsiderada.
(3) O mosaicismo envolvendo várias células ou colônias de células em uma única cultura primária, que é difícil de interpretar, mas em geral é tido como refletindo um pseudomosaicismo que surgiu em cultura.

A contaminação por células maternas é uma explicação possível para alguns casos de mosaicismo aparente com linhagens celulares XX e XY. É mais comum em culturas de CVS de lon-

go prazo que em culturas de células do líquido amniótico, como uma conseqüência da íntima associação entre as vilosidades coriônicas e o tecido materno (ver Fig. 18.3). Para diminuir o risco de contaminação por células maternas, qualquer decídua materna presente em uma amostra de vilosidades coriônicas deve ser cuidadosamente dissecada e removida, embora mesmo a mais cuidadosa dissecação de vilosidades coriônicas não elimine todas as células de origem materna. Quando a suspeita de contaminação por células maternas não pode ser excluída (p. ex., por genotipagem de DNA usando polimorfismos), recomenda-se uma amniocentese para permitir uma segunda análise cromossômica.

Nos estudos de CVS, as discrepâncias entre os cariótipos encontrados no citotrofoblasto, estroma viloso e feto foram relatadas em cerca de 2% das gestações estudadas com 10 a 11 semanas de gestação. O mosaicismo às vezes está presente na placenta mas não no feto, uma situação chamada de **mosaicismo confinado à placenta** (Fig. 18.7). Ocasionalmente, o mosaicismo com uma linhagem celular normal e uma linhagem celular trissômica foi relatado quando a criança ou o feto nativivo tem trissomia do 13 ou do 18 sem mosaicismo, e a porcentagem de células placentárias com um cariótipo normal varia de 12% a 100%. Este achado sugere que quando o zigoto é trissômico, uma linhagem celular placentária normal estabelecida por perda pós-zigótica do cromossomo adicional em uma célula genitora do citotrofoblasto pode melhorar a probabilidade de sobrevida intra-uterina de um feto trissômico.

O mosaicismo placentário confinado para qualquer cromossomo, mas particularmente para a trissomia do 15, cria a preocupação adicional de que a diploidia fetal possa ter surgido por um "resgate trissômico" (*trisomy rescue*). Este termo refere-se à perda de um cromossomo extra na fase pós-zigótica, um evento que supostamente permite uma viabilidade fetal. Se o feto retiver duas cópias do cromossomo 15 de um genitor, entretanto, o resultado será uma dissomia uniparental (ver Caps. 5 e 9). Como alguns genes no cromossomo 15 são imprintados, a dissomia uniparental deste cromossomo deve ser excluída, pois duas cópias maternas do cromossomo 15 causam a síndrome de Prader-Willi e duas cópias paternas estão associadas à síndrome de Angelman (ver Cap. 5).

A confirmação e a interpretação de mosaicismo estão entre os desafios mais difíceis na consulta genética para um diagnóstico pré-natal, pois, no momento, as informações clínicas sobre os vários tipos possíveis e extensões do mosaicismo são inadequadas. Estudos posteriores (amniocentese que segue a CVS ou cordocentese após amniocentese) e a literatura médica podem dar alguma orientação, mas às vezes a interpretação ainda permanece incerta. A triagem ultra-sonográfica pode ser tranqüilizadora se for observado um crescimento normal e não forem encontradas anomalias congênitas.

Os genitores devem ser informados antecipadamente quanto à possibilidade de que seja encontrado o mosaicismo e que a interpretação do mosaicismo pode ser incerta. Após o nascimento, deve-se fazer um esforço para verificar quaisquer achados cromossômicos anormais suspeitos com base no diagnóstico pré-natal. No caso de interrupção da gestação, a verificação deve ser procurada pela análise dos tecidos fetais. A confirmação do mosaicismo, ou sua ausência, pode ser útil com relação aos aspectos de conduta médica, bem como para a informação genética do casal específico e de outros membros da família.

Falhas de Cultura. Se os casais têm uma oportunidade de considerar o término de uma gestação quando uma anomalia no feto é encontrada, eles devem ser informados o mais cedo possível. Como o diagnóstico pré-natal é sempre uma corrida contra o tempo, a taxa de falhas de cultura pode ser uma preocupação. Felizmente esta taxa é baixa. Quando uma cultura de CVS não cresce, há tempo para repetir o estudo cromossômico com a amniocentese. Se a cultura de células do líquido amniótico falha, pode ser oferecida a repetição da amniocentese ou uma cordocentese, dependendo da idade fetal.

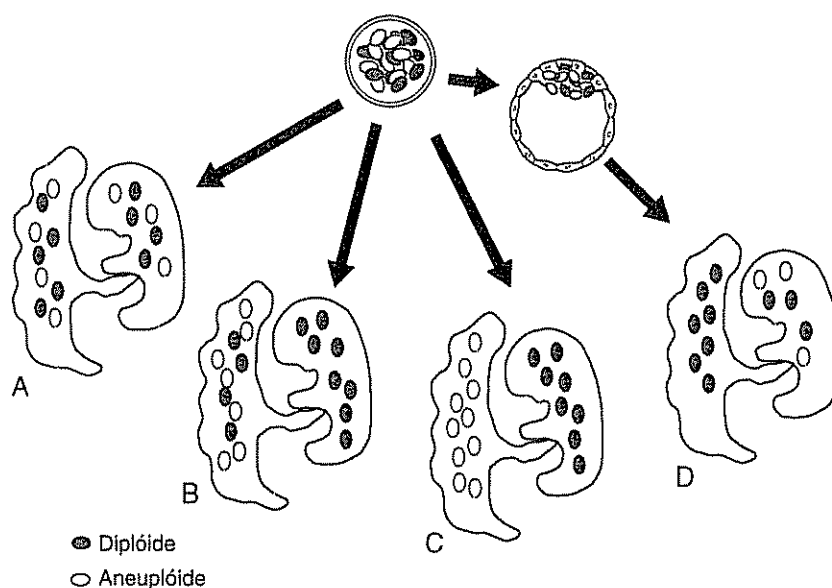



Fig. 18.7 Os diferentes tipos de mosaicismo que podem ser detectados por diagnóstico pré-natal. *A*, Mosaicismo generalizado afetando tanto o feto quanto a placenta. *B*. Mosaicismo placentário confinado com presença de linhagens celulares normal e anormal. *C*. Mosaicismo placentário confinado apenas com presença de linhagem celular anormal. *D*. Mosaicismo confinado ao embrião. (Adaptado de Kalousek D K. [1994] Current topic: Confined placental mosaicism and intrauterine fetal development. Placenta 15: 219-230.)

Achados Adversos Inesperados. Ocasionalmente, a análise cromossômica pré-natal feita para excluir uma aneuploidia revela outro achado cromossômico incomum: por exemplo, um número cromossômico normal, mas uma variante comum, um rearranjo raro ou um cromossomo marcador. Em tal caso, como o significado do achado no feto não pode ser avaliado até que os cariótipos parentais sejam conhecidos, ambos os genitores devem ser cariotipados para se determinar se o achado visto no feto é *de novo* ou herdado. Os rearranjos estruturais não-balanceados ou *de novo* podem causar graves anomalias fetais. Se um dos genitores for portador de um rearranjo estrutural visto na forma não-balanceada no feto, as conseqüências para o feto podem ser graves. Por outro lado, se o mesmo achado for visto em um genitor normal, é provável que seja uma alteração benigna*, sem conseqüências prejudiciais. As exceções potenciais a esta orientação incluem a possibilidade de dissomia uniparental (ver Cap. 5) em uma região do genoma que contém genes imprintados (ver Fig. 9.13). Nesta situação, um rearranjo balanceado herdado pode causar graves anomalias fetais. Esta possibilidade pode ser excluída se tiver havido uma transmissão prévia do mesmo rearranjo balanceado de um genitor de origem do mesmo sexo como o genitor transmissor na atual gestação.

Dosagens Bioquímicas para Doenças Metabólicas

Mais de 100 distúrbios metabólicos podem ser diagnosticados na fase pré-natal em tecido de vilosidade coriônica ou células do líquido amniótico cultivadas (Quadro 18.6), e algumas condições raras podem até ser diretamente identificadas por dosagem de uma substância no líquido amniótico. A maioria dos distúrbios metabólicos é rara na população em geral, mas tem um alto risco de recorrência (geralmente 25% nas proles, pois a maioria é de condições autossômicas recessivas). Como cada condição é rara, a experiência do laboratório que está fazendo o teste diagnóstico pré-natal é muito importante. Assim, é desejável o encaminhamento a centros especializados. Sempre que possível a dosagem bioquímica direta em tecido de CV — em oposição à cultura de tecido — é preferida, para evitar a má interpretação dos resultados devido à expansão em cultura do número de células maternas contaminantes.

Os testes bioquímicos têm uma vantagem significativa em relação à análise de DNA em alguns casos: enquanto a análise de DNA por detecção direta de uma mutação é precisa apenas para esta mutação e não para outros alelos no locus, os testes bioquímicos podem detectar anomalias causadas por qualquer alelo mutante que tenha um efeito significativo no funcionamento da proteína. Esta vantagem é particularmente significativa para distúrbios caracterizados por um alto grau de heterogeneidade alélica ou por uma alta proporção de novas mutações (p. ex., distúrbios letais recessivos ligados ao X, ver Cap. 5).

Análise de DNA

Vários distúrbios, muitos dos quais não eram previamente detectáveis na fase pré-natal, agora podem ser diagnosticados por análise de DNA (ver Quadro 18.1). A análise de DNA pode ser feita seja por meio de marcadores proximamente ligados ou por detecção direta da mutação. Qualquer técnica usada para triagem direta de mutação (ver Cap. 4) pode ser usada para diagnóstico pré-natal. O número de distúrbios que podem ser diagnosticados e a precisão e a eficiência da análise estão aumentando rapidamente, à medida que novos enfoques são desenvolvidos, novas mutações são caracterizadas e doenças genéticas adicionais são mapeadas.

Quando possível, os métodos diretos de detecção de uma determinada mutação são os preferidos. Como o espectro de mutações varia de distúrbio para distúrbio, e em geral varia entre grupos raciais e étnicos dentro de um distúrbio em particular, a aplicação da análise de DNA para diagnóstico pré-natal permanece altamente especializada, exceto para doenças comuns, tais como a fibrose cística e a síndrome do X frágil. Laboratórios para diagnósticos específicos desenvolvem especialistas para o subgrupo de distúrbios genéticos que se manifestam com mais freqüência em sua prática ou pesquisa. O grau de certeza do diagnóstico é próximo a 100% quando é possível a detecção direta de uma mutação. Como observado antes, entretanto, se o distúrbio no paciente for decorrente de uma mutação diferente daquela que está sendo procurada, a análise de DNA pode deixar de detectá-lo. Além disso, o diagnóstico pré-natal pela análise de DNA pode não ser preditivo da apresentação clínica exata em uma gestação afetada. Por exemplo, na neurofibromatose, tipo I, uma mutação especifica pode levar a uma grave

QUADRO 18–6

Exemplos de Distúrbios Metabólicos Diagnosticados por Dosagem Enzimática ou Análise de DNA em Vilosidades Coriônicas ou Cultura de Células do Líquido Amniótico

Distúrbios de aminoácidos e ácidos orgânicos
Fenilcetonúria
Homocistinúria
Doença da urina em xarope de bordo
Acidemia metilmalônica
Acidemia propiônica

Distúrbios de carboidratos
Galactosemia
Doenças de armazenamento de glicogênio, tipos II, III, IV

Distúrbios de purinas e pirimidinas
Deficiência de adenosina desaminase

Distúrbios do metabolismo de colesterol e esteróides
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz
Ictiose ligada ao X

Distúrbios do metabolismo de metais
Síndrome de Menkes

Distúrbios lisossômicos
Síndrome de Hurler
Doença de Krabbe
Doença de Niemann-Pick
Doença de Tay-Sachs

Distúrbios peroxissômicos
Condrodisplasia pontilhada
Síndrome de Zellweger
Adrenoleucodistrofia ligada ao X

*N.T.: Benigna não significa benéfica, e o mais didático seria usar o termo "neutra".

manifestação clínica em um membro da família e a uma manifestação branda em outro

Quando a aplicação de métodos diretos de diagnóstico de DNA é impossível ou não é prática, pode-se usar o enfoque indireto da análise de ligação genética Se os marcadores de DNA estiverem disponíveis, a precisão do diagnóstico depende do quanto os marcadores estão proximamente ligados ao gene da doença e se os estudos familiares apropriados podem ser feitos e são informativos (ver Caps. 8 e 19).

O EFEITO DO DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DAS DOENÇAS GENÉTICAS

Na grande maioria dos casos, os achados no diagnóstico pré-natal são normais, e os genitores são assegurados de que seu filho não será afetado pela condição em questão. Infelizmente, em uma pequena proporção de casos, encontra-se um grave defeito genético fetal. Como a terapia pré-natal efetiva não está disponível para a maioria dos distúrbios, os genitores podem então optar por terminar a gestação. Poucos assuntos hoje em dia são tão debatidos quanto o aborto eletivo, mas, a despeito das restrições legais em algumas áreas, o aborto eletivo é amplamente usado. Entre todos os abortos eletivos, aqueles realizados em função do diagnóstico pré-natal de uma anomalia no feto correspondem a apenas uma proporção muito pequena. Sem um meio legal de encerrar a gestação, o diagnóstico pré-natal não teria se desenvolvido no procedimento aceito que se tornou.

Algumas mulheres grávidas que não considerariam o término da gestação, entretanto, pedem o diagnóstico pré-natal para reduzir a ansiedade ou para que possam se preparar para o nascimento de um filho com um distúrbio genético. A pergunta então é se a solicitação é justificável, pois as técnicas invasivas têm um risco associado de perda fetal. Na prática, o uso do diagnóstico pré-natal por técnicas invasivas parece estar aumentando porque os riscos são baixos comparados com o risco *a priori* dos casais e porque muitos profissionais de saúde acreditam que os genitores têm direito à informação Esta informação pode ser usada para a preparação psicológica, bem como para a conduta do parto e do neonato.

No nível populacional, o diagnóstico pré-natal combinado com o aborto eletivo levou a um grande declínio na incidência de alguns distúrbios graves, tais como a doença de Tay-Sachs e a β-talassemia, em determinados grupos populacionais. O diagnóstico pré-natal não pode, entretanto, reduzir a freqüência gênica destes distúrbios (ver Cap. 7). Na verdade, há uma possibilidade de que a freqüência de alguns genes deletérios aumente na população se os casais compensarem a perda dos homozigotos tendo filhos adicionais, que têm 2/3 de risco de serem heterozigotos.

A principal vantagem do diagnóstico pré-natal não é para a população, mas para a família imediata. Os genitores em risco de ter um filho com uma grave anomalia podem ter gestações que não tenham risco, com o conhecimento de que podem saber logo no início da gestação se o feto tem a anomalia.

Os genitores e os profissionais de saúde devem considerar os aspectos éticos envolvidos no diagnóstico pré-natal As novas tecnologias reprodutivas aumentaram as preocupações éticas. A dificuldade, como sempre, é balancear os benefícios para as pessoas com os interesses da sociedade como um todo. Os profissionais de saúde, os bioeticistas e as famílias com quem trabalham devem estar cientes dos novos desenvolvimentos tanto na genética básica quanto na aplicada para tomar as decisões do modo mais informado e ético possível. De fato, a aplicação dos conhecimentos genéticos à melhoria da saúde humana é a meta final da genética na medicina (ver Cap. 20).

CONCLUSÃO

O diagnóstico pré-natal é um campo em constante mudança, com ampliação de conhecimentos e novas tecnologias. Assim, qualquer tentativa de definir a situação rapidamente se torna desatualizada. Os profissionais de saúde devem estar cientes da probabilidade de mudanças e da importância de obter acesso às últimas informações, que devem estar disponíveis a eles pelos programas de diagnóstico pré-natal ou clínicas de genética Do mesmo modo, as clínicas de genética devem aceitar a responsabilidade de manter-se em dia com os novos desenvolvimentos e as práticas de acesso a eles. As famílias que podem usar o diagnóstico pré-natal também devem estar cientes da importância de obter as últimas informações antes de começar uma gravidez ou antes de tomar uma decisão irrevogável de não se reproduzir. Muitos casais em risco de ter um filho com um grave distúrbio genético foram capazes de ter filhos saudáveis devido ao diagnóstico pré-natal.

Referências Gerais

Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson-Smith MA (1992) Prenatal Diagnosis and Screening Churchill Livingstone, Edinburgh.

Canadian guidelines for prenatal diagnosis of genetic disorders: An update (1993) J Soc Obstet Gynaecol Can 15 Suppl:15–39.

Dimmick JE, Kalousek DK (1992) Developmental Pathology of the Embryo and Fetus. JB Lippincott, Philadelphia.

Harrison MR, Golbus MS, Filly RA (1991) The Unborn Patient, Prenatal Diagnosis and Treatment, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia.

Milunsky A (1998) Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis. Prevention, and Treatment, 4th ed Johns Hopkins University Press, Baltimore

Referências Específicas aos Tópicos Particulares

Brambati B, Tului L., Cislaghi C, et al (1998) First 10,000 chorionic villus samplings performed on singleton pregnancies by a single operator. Prenat Diagn 18:255–266

Copel JA, Bahado-Singh RO (1999) Prenatal screening for Down's Syndrome—A search for the family's values. N Engl J Med 341:521–522.

Friedman AH, Copel JA, Kleinman CS (1993) Fetal echocardiography and fetal cardiology: Indications, diagnosis and management. Semin Perinatol 17:76–88.

Handyside AH (1996) Preimplantation genetic diagnosis today Hum Reprod 11(Suppl 1):139–151

Rhoads GG, Jackson LG, Schlesselman SE, et al (1989) The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities N Engl J Med 320: 609–617.

Snijders RJM, Nicolaides KH (1996) Ultrasound Markers for Fetal Chromosomal Defects Parthenon Publishing Group, New York.

The Canadian Early and Midtrimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group (1998) Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis Lancet 351:242–247.

Wald NJ, Watt HC, Hackshaw AK (1999) Integrated screening for Down's syndrome based on tests performed during the first and second trimesters N Engl J Med 341:461–467

URLs para Recursos da Web Relacionados ao Diagnóstico Pré-natal

New York OnLine Access to Health (NOAH)
http://www.noah-health org/english/providers/mod html# TESTING
http://www.noah-health.org/english/providers/mod html# POTENTIAL PROBLEMS AND RISKS
A joint effort by The City University of New York, The Metropolitan New York Library Council, The New York Academy of Medicine, and The New York Public Library to provide health information online. Includes information on prenatal diagnosis from the March of Dimes Birth Defects Foundation

Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada *http://www sogc org/SOGCnet/sogc docs/common/guide/pdfs/ps75 pdf*
Practice guidelines for health care providers involved in prenatal screening and diagnosis

Genetests *http://www genetests.org/* A US government supported website maintained by the University of Washington and Seattle Children's Hospital providing information on testing laboratories as well as educational material on genetic testing, including prenatal diagnosis

Problemas

1. Faça a correspondência dos termos abaixo com o comentário apropriado na parte inferior.
   - (a) Imunoglobulina Rh
   - (b) 10.ª semana de gestação
   - (c) Cordocentese
   - (d) Mosaicismo
   - (e) 16.ª semana de gestação
   - (f) Alfa-fetoproteína no soro materno
   - (g) Aneuploidia
   - (h) Higroma cístico
   - (i) Vilosidades coriônicas
   - (j) Líquido amniótico

   _______ Método de obtenção de sangue fetal para cariotipagem
   _______ Época usual para se fazer a amniocentese
   _______ Nível aumentado quando o feto tem defeito de tubo neural
   _______ Contém células fetais viáveis em cultura
   _______ Principal problema citogenético no diagnóstico pré-natal
   _______ Diagnóstico por ultra-som indica possível síndrome de Turner
   _______ Risco aumenta com a idade materna
   _______ Época usual na qual se faz a CVS
   _______ Derivado de tecido extra-embrionário
   _______ Usado para evitar imunização de mulher Rh negativo

2. Um casal tem um filho com síndrome de Down, o qual tem uma translocação 21q21q herdada da mãe. O diagnóstico pré-natal poderia ser útil para a próxima gestação deste casal? Explique.

3. A cultura de células de uma amostra de vilosidades coriônicas mostra duas linhagens de células: 46,XX e 46,XY. Isto necessariamente significa que o feto é anormal? Explique.

4. Que dois importantes tipos de informação sobre um feto podem ser indicados (mas não provados) pela dosagem de alfa-fetoproteína, gonadotrofina coriônica humana e estriol não-conjugado no soro materno?

5. Se todos os fetos com os distúrbios que se seguem pudessem ser identificados e as gestações fossem interrompidas, qual seria o efeito na frequência populacional da doença? Na freqüência populacional dos alelos mutantes no locus?
   - (a) PKU
   - (b) Neurofibromatose, tipo I
   - (c) Doença de Huntington

6. Um casal teve um aborto espontâneo de primeiro trimestre em sua primeira gestação e solicita informação genética.
   - (a) Que proporção de todas as gestações são abortadas no primeiro trimestre?
   - (b) Qual a anomalia genética mais comum encontrada em tais casos?
   - (c) Supondo que não existam outros indicadores, este casal deve receber diagnóstico pré-natal para sua próxima gestação?

7. Uma jovem mulher consulta um geneticista durante sua primeira gestação. Seu irmão foi previamente diagnosticado com distrofia muscular Duchenne e já morreu. A mulher foi testada bioquimicamente e descobriu-se que tinha um nível elevado de creatina cinase, o que indica que ela é portadora do gene da doença.

   Infelizmente, nenhuma análise de DNA foi feita no irmão da mulher para determinar se a mutação em seu gene *DMD* era uma deleção. A mulher foi investigada por análise molecular e dada como heterozigota (A1/A2) para um marcador microssatélite proximamente ligado ao gene *DMD*. Nenhum parente, exceto os pais da mulher, estavam disponíveis para análise.
   - (a) A fase da mutação na mulher pode ser determinada com a análise das pessoas disponíveis?
   - (b) Esta informação pode ser usada para diagnosticar sua gestação?
   - (c) Que outra análise molecular poderia ser feita no feto?

8. Discuta as vantagens e desvantagens relativas dos seguintes procedimentos diagnósticos e cite os tipos de distúrbios para os quais eles são indicados ou não indicados: amniocentese, CVS e triagem do soro materno.

Informação Genética e Avaliação de Risco

INFORMAÇÃO GENÉTICA

A genética clínica está envolvida com o diagnóstico e a conduta dos aspectos médicos, sociais e psicológicos das doenças hereditárias. Como em todas as outras áreas da medicina, é essencial fazer um diagnóstico correto e dar um tratamento apropriado, que deve incluir a ajuda à pessoa afetada e aos membros da família no sentido de que compreendam e se ajustem à natureza e às conseqüências do distúrbio. Quando se suspeita que um distúrbio é hereditário, entretanto, há uma dimensão adicional: a necessidade de informar aos outros membros da família quanto aos seus riscos e os meios disponíveis para que eles modifiquem estes riscos. Do mesmo modo que a característica singular das doenças genéticas é sua tendência em recorrer dentro das famílias, o aspecto singular da consulta genética é seu enfoque não apenas no paciente original, mas também nos membros da família do paciente, tanto os atuais quanto os futuros. A consulta genética, uma atividade central na genética médica, não apenas informa o paciente e seus familiares, como também fornece orientação psicológica para ajudar as pessoas a se adaptarem e se ajustarem ao impacto e às implicações do distúrbio na família.

Este capítulo enfoca o papel do consultor genético em dar informações e fazer a avaliação dos riscos. O tópico mais amplo dos aspectos psicológicos da consulta está além do escopo deste capítulo, e o leitor deve consultar as Referências Gerais ao final do capítulo.

Indicações Comuns para a Consulta Genética

O Quadro 19.1 cita algumas das situações mais comuns que levam as pessoas a procurar a consulta genética. Em geral, as pessoas que procuram uma consulta genética (os **consulentes**) são os genitores de um filho com uma condição genética potencial ou conhecida, mas o consulente pode ser um adulto com uma anomalia ou com uma história familiar de uma anomalia. A consulta genética também é uma parte integral dos testes pré-natais (ver Cap. 18) e dos testes genéticos e programas de triagem (discutidos no Cap. 20).

O Processo da Consulta Genética

Os padrões estabelecidos de cuidados médicos requerem que os prestadores de serviços genéticos obtenham uma história que inclua informações étnicas e familiares, informem os pacientes sobre os riscos genéticos para eles e outros membros da família, ofereçam testes genéticos de diagnóstico pré-natal quando indicados e destaquem as várias opções de tratamento ou conduta para reduzir o risco da doença. Em geral, os pacientes não são instruídos sobre que decisões tomar com relação aos vários testes e opções de conduta, mas sim recebem informações e apoio. Este enfoque de consulta, chamado de **consulta não-direcionada**, tem sido adotado amplamente como o padrão da prática no campo. Deve-se enfatizar que a consulta genética não se limita ao fornecimento de informações e ao cálculo de risco da doença, mas trata-se de um processo de comunicação. A capacidade de definir e abordar os complexos aspectos psicossociais associados a um distúrbio genético em uma família é central a esta prática. A abordagem destes aspectos pode ser feita de forma mais efetiva com o tempo, ao longo de contatos periódicos com a família, à medida que as questões médicas ou sociais tornam-se relevantes para a vida dos envolvidos.

QUADRO 19-1

Indicações Comuns para Encaminhamento

1. Filho anterior com múltiplas anomalias congênitas, retardo mental ou um defeito isolado de nascimento, tal como defeito de tubo neural, fenda labial e palatina
2. História familiar de uma condição hereditária, tal como fibrose cística, síndrome do X frágil ou diabetes
3. Diagnóstico pré-natal para idade materna avançada ou outra indicação
4. Consangüinidade
5. Exposição a teratógeno, tal como drogas ocupacionais, medicamentos, álcool
6. Abortos repetidos ou infertilidade
7. Anomalia ou condição genética recém-diagnosticada
8. Antes de fazer um teste genético e após receber os resultados, particularmente quando se testa a suscetibilidade para distúrbios de manifestação tardia, tais como câncer ou doença neurológica
9. Como acompanhamento para um teste positivo em neonato, como na PKU, ou um teste de triagem de heterozigoto, tal como na Tay-Sachs

O Papel dos Consultores Genéticos

A consulta genética no passado em geral era dada por um médico, como parte integral do tratamento clínico do paciente e seus familiares. Na verdade, a consulta genética ainda permanece um componente importante da prática da genética médica. À medida que o volume dos conhecimentos genéticos e a extensão e sofisticação dos diagnósticos laboratoriais cresceram, assim também aconteceu com a demanda por educação e consulta para ajudar os pacientes e seus familiares a lidar com os vários aspectos complexos levantados pelas doenças genéticas. A genética clínica é particularmente consumidora de tempo, quando comparada com outros campos clínicos, pois requer uma ampla preparação e acompanhamento, além do contato direto com o paciente. Cada vez mais os serviços de consulta genética estão usando **consultores genéticos**, profissionais qualificados e treinados em genética *e* consulta, que servem como membros de uma equipe de cuidados de saúde ao lado dos médicos geneticistas ou médicos de outras especialidades (p. ex., na prática obstétrica, na clínica ortopédica ou na clínica de câncer). A consulta genética nos EUA e no Canadá é uma profissão auto-regulada, que tem seu próprio conselho (o American Board of Genetic Counselors) que supervisiona os programas de treinamento e a entrega de certificados aos praticantes.

Os consultores genéticos desempenham um papel essencial na genética clínica, participando em muitos aspectos da investigação e da conduta dos problemas genéticos. Um consultor genético em geral é o primeiro ponto de contato que um paciente faz com os serviços de genética clínica, fornece consulta genética diretamente aos consulentes, ajuda os pacientes e suas famílias a lidar com muitos aspectos psicológicos e sociais que surgem durante a consulta genética e continua tendo um papel de apoio e sendo uma fonte de informações após a investigação clínica e a consulta formal terem se completado. Os consultores também são muito ativos no campo dos testes genéticos. Eles fornecem uma ligação próxima entre os médicos, os laboratórios de diagnóstico e as próprias famílias. Seus conhecimentos especializados são valiosos para os laboratórios clínicos, pois a explicação e a interpretação dos testes genéticos para os pacientes e os médicos encarregados em geral requer um conhecimento sofisticado de genética e genômica, bem como boas habilidades de comunicação.

Prevenção e Recorrência em Famílias

Para muitas famílias que procuram a consulta genética, uma das principais metas é avaliar o risco da doença hereditária em seus filhos e saber que opções estão disponíveis para evitar a recorrência daquele distúrbio genético particular em questão. Embora o diagnóstico pré-natal seja um enfoque que em geral pode ser oferecido às famílias, não é uma solução universal para o risco dos problemas genéticos na prole. Existem muitos distúrbios para os quais o diagnóstico pré-natal não é factível, e para muitos genitores não é uma opção aceitável, mesmo que disponível. Outras medidas disponíveis para a recorrência incluem as seguintes:

1. Os testes genéticos laboratoriais (cariotipagem, análise bioquímica ou análise de DNA) às vezes tranqüilizam os casais que têm uma história familiar de um distúrbio genético, pois mostram que eles *não* têm um risco aumentado de ter um filho com uma doença genética específica. Em outros casos, tais testes indicam que o casal tem um risco aumentado. A consulta genética é recomendada tanto antes quanto depois de tais testes para ajudar os consulentes a tomar uma decisão informada quanto a fazer o teste, bem como a compreender e usar a informação obtida pelo teste.
2. Se os genitores planejam não ter mais filhos ou não ter filhos, a **contracepção** ou **esterilização** pode ser sua escolha, e eles podem precisar de informações sobre os possíveis procedimentos ou um encaminhamento apropriado.
3. Para genitores que querem ter um ou mais filhos, a **adoção** é uma possibilidade.
4. A **inseminação artificial** pode ser apropriada se o pai tiver um gene para um defeito gênico autossômico dominante ou ligado ao X, bem como um defeito cromossômico herdável, mas obviamente não é indicada se for a mãe o genitor com tal defeito. A inseminação artificial também é útil se ambos os genitores forem portadores de um distúrbio autossômico recessivo. A fertilização *in vitro* com um **ovócito doado** pode ser apropriada se a mãe tiver um gene para um defeito autossômico ou tiver um defeito ligado ao X. Em ambos os casos, a consulta genética e os testes genéticos apropriados dos espermatozóides ou ovócito doador devem ser parte do processo.
5. Em alguns distúrbios, a análise do DNA de embriões no estágio de pré-implantação pode ser feita usando a reação em cadeia da polimerase de uma única célula obtida de um embrião inicial gerado por fertilização *in vitro* (ver Caps. 17 e 18). Para alguns genitores, a decisão de não implantar um embrião dado como anormal seria muito mais aceitável que o aborto em um estágio posterior.

Se os genitores decidem interromper uma gestação, fornecer uma informação relevante e dar apoio é uma parte apropriada da consulta genética. O acompanhamento periódico por visitas adicionais ou por telefone em geral é agendado para um ano ou mais após o término da gestação.

Aspectos Psicológicos

Os pacientes e as famílias que lidam com um risco de um distúrbio genético ou lidam com a ocorrência real do distúrbio estão sujeitos a vários graus de estresse emocional e social. Embora isto também seja verdade para os distúrbios não-genéticos, a preocupação gerada pelo conhecimento de que a condição pode recorrer, a culpa ou censura que algumas pessoas sentem e a necessidade de tomar decisões relacionadas à reprodução podem originar um grande sofrimento. Muitas pessoas têm forças para lidar pessoalmente com tais problemas; preferem receber más notícias do que ficar desinformadas e podem tomar suas próprias decisões com base na informação mais completa e precisa que possam obter. Outras pessoas precisam de muito mais apoio e podem precisar de psicoterapia. Os aspectos psicológicos da consulta genética estão além do escopo deste livro, mas vários livros citados nas Referências Gerais, ao final deste capítulo, dão uma introdução a este importante campo.

Organizações de Apoio

Organizações dedicadas à auto-ajuda são usadas por muitas famílias. Estas organizações, que em geral enfocam uma única doença ou grupo de doenças, podem ajudar os interessados em compartilhar sua experiência com outros que enfrentam o mesmo problema, aprender como lidar com os problemas cotidianos

Informação Genética

O propósito da informação genética é não só fornecer dados, mas também apoiar as famílias em risco de ter — ou que já tiveram — membros com defeitos de nascimento ou distúrbios genéticos. A informação genética ajuda as famílias ou os indivíduos a:

1. Compreender os fatos médicos, incluindo o diagnóstico, o curso provável do distúrbio e a conduta disponível;
2. Compreender o modo pelo qual a hereditariedade contribui para o distúrbio e o risco de recorrência para eles ou outros membros da família;
3. Compreender as opções para lidar com o risco de recorrência;
4. Identificar os valores, as crenças, as metas e o parentesco de afetados pelo risco ou presença de doença hereditária;
5. Escolher o curso de ação que parece mais apropriado a eles em vista de seu risco, suas metas familiares e seus padrões éticos e religiosos; e
6. Fazer o melhor ajuste possível ao distúrbio ou ao risco de recorrência deste distúrbio, ou ambos, dando apoio às famílias e fazendo encaminhamentos a serviços apropriados de apoio ou grupos, ou ambos.

causados pelo distúrbio, conhecer novos desenvolvimentos na terapia ou prevenção e promover pesquisas sobre a condição. Muitos grupos de apoio têm *sites* na Internet e salas de conversa eletrônica através das quais os pacientes e as famílias dão e recebem informações e conselhos, fazem e respondem perguntas e obtêm o apoio emocional de que precisam. O encaminhamento a grupos de apoio em geral é feito pelos centros de genética. Um grupo conhecido como Genetic Alliance foi formado para coordenar as atividades de muitos grupos individuais.

CONDUTA DE CASOS NA INFORMAÇÃO GENÉTICA

Embora a conduta de casos de consulta genética deva ser individualizada para cada necessidade e situação do paciente, um enfoque genético pode ser resumido conforme mostrado no Quadro 19.2.

Um Exemplo de Conduta de um Caso Genético

Para fazer uma apreciação do processo de informação genética, consideraremos um encaminhamento hipotético para consulta pré-natal como um exemplo de uma ou mais situações comuns enfrentadas pelos consultores.

B.D. é encaminhada a uma clínica de genética com 16,5 semanas de gestação devido a uma triagem positiva de soro materno (MSS) para síndrome de Down (ver Cap. 18). Ela tem 30 anos de idade e o resultado de sua MSS indica que seu risco de ter um filho com síndrome de Down está igual ao de uma mulher com 37 anos, ou seja, está aumentado.

QUADRO 19-2

Conduta em Caso de Informação Genética

Coleta de Informações
História familiar (questionário)
História médica
Testes e/ou avaliações adicionais

Avaliação
Exame físico
Confirmação ou estabelecimento do diagnóstico, se possível

Informação
Natureza e conseqüência do distúrbio
Risco de recorrência
Disponibilidade de outros ou futuros testes
Tomada de decisão
Indicação para outros especialistas, agências de saúde, grupos de apoio

Acompanhamento
Avaliação clínica contínua, especialmente se não houver diagnóstico
Apoio psicossocial

Pré-avaliação

História Familiar

As preocupações de B.D. e a qualidade de qualquer informação prévia que ela tenha recebido devem ser avaliadas primeiro. Ela e seu parceiro, se ele estiver presente, receberiam então uma idéia do que esperar durante o processo da consulta genética (isto pode ser feito por telefone ou pessoalmente). A etapa seguinte seria fazer um heredograma detalhado (Fig. 19.1), que revelaria que o irmão de B.D. está com retardo de desenvolvimento.

História Médica

A história da gestação de B.D. seria obtida primeiro. Até este ponto ela não é complicada. Em uma tentativa de determinar a etiologia do retardo de desenvolvimento do irmão de B.D. (ver heredograma, Fig. 19.1), solicitaríamos os registros médicos e tentaríamos marcar uma avaliação para ele. Embora não exista muito tempo para excluir um risco potencial para a gestação de B.D., a solicitação de registros externos ainda pode ser feita, pois a precisão em estabelecer um diagnóstico é crucial para o fornecimento da informação genética. B.D. diz que sua família nunca discutiu os problemas do irmão e que deu a entender a ela que o irmão "nasceu normal" e então sofreu um dano cerebral causado por uma febre. Ele parece não apresentar nenhuma anomalia congênita. Ela trará fotos da família.

Avaliação e Investigações

Como B.D. e seu parceiro não são consangüíneos, as etiologias autossômicas recessivas não acrescentam um risco a esta gestação. A equipe genética consideraria então as possíveis causas do retardo de desenvolvimento no irmão de B.D. que possam causar algum risco para a gestação. Tais causas provavelmente incluem as anomalias cromossômicas devidas

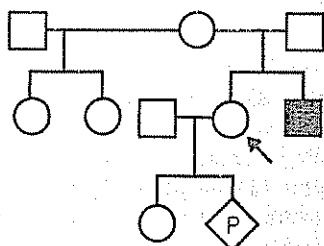



Fig. 19.1 Heredograma da família da consulente. Ela foi encaminhada para uma avaliação de soro materno elevado e relata que tem um irmão com retardo de desenvolvimento (*símbolo escuro*). Representado como em Bennett R. L., Steinhaus K. A., Urich S. B., *et al.* (1996) Recommendations for standardized pedigree nomenclature. J Genet Counsel 4:26.

a um rearranjo estrutural herdável, síndrome do X frágil e outras causas ligadas ao X de retardo mental. Os testes específicos estão disponíveis para as duas primeiras causas potenciais.

Consulta Genética

No enfoque deste caso, o consultor genético deve começar destacando os dois aspectos primários a serem discutidos: os resultados da MSS e a história familiar do retardo de desenvolvimento. Uma discussão dos resultados da MSS incluiriam a revisão das limitações deste teste, a estimativa do risco e como este casal interpreta pessoalmente estes riscos, uma breve discussão sobre a síndrome de Down e as opções disponíveis para eles com relação à gestação. Estas opções incluem a amniocentese para determinar o cariótipo fetal, a continuidade da gestação sem testes invasivos ou talvez, se ficarem indecisos, um ultra-som detalhado para fornecer informações adicionais, embora limitadas.

Neste ponto, o consultor genético poderia levar a história da família de B.D. para discussão, bem como as preocupações de B.D. quanto a ter um filho com o mesmo distúrbio de seu irmão. As opções disponíveis para um maior esclarecimento seriam revistas (p. ex., examinar o sangue de B.D. para excluir um rearranjo cromossômico estrutural e permitir o teste para a condição de portadora de X frágil). Além disso, se este casal se sentir decidido a fazer a amniocentese devido ao resultado da MSS, os amniócitos também podem ser mandados para um laboratório para teste molecular de síndrome do X frágil se B.D. for uma portadora. A discussão também envolveria os testes específicos a serem feitos, incluindo uma avaliação de expansão do trinucleotídeo *FMR1* e metilação (ver Cap. 12) e a dificuldade inerente em determinar um fenótipo no evento de que o feto seja uma menina e tenha uma repetição expandida. Também seria explorado como os pais se sentem sobre tal resultado e como encaram as opções, isto é, continuar ou interromper a gestação. Finalmente, o consultor genético não deve deixar a impressão de que se a amniocentese não revelar nenhuma anomalia cromossômica nem uma mutação de X frágil, o feto estará livre de qualquer doença genética ou defeitos de nascimento. O risco residual para um defeito de nascimento (2% a 3%) enfrentado por todos os casais que planejam um filho ainda deve ser revisto com os consulentes.

Acompanhamento

B.D. é, de fato, heterozigota para uma repetição expandida de síndrome do X frágil, e sua amniocentese revela um feto masculino com um cariótipo normal e com um tamanho de repetição CGG na faixa normal. Conhecer a situação de portadora leva a uma provável conclusão de que o irmão de B.D. tem síndrome do X frágil e que sua mãe é uma portadora. Novamente, este achado tem implicações para as meio-irmãs de B.D., pois elas também podem ser portadoras (ver a Fig. 19.1). B.D. seria estimulada a compartilhar esta informação com suas irmãs, e o consultor recomendaria que elas procurassem uma consulta genética e, se desejassem, os testes. A responsabilidade do médico e do consultor genético em informar não passa da consulente para os outros membros da família. Muitos geneticistas e consultores envolvem bioeticistas para obter orientação no estabelecimento das normas para uma prática apropriada. Em geral é aceito que o consulente tem direito à informação confidencial, o que não pode ser quebrado sem a sua permissão, a menos que circunstâncias excepcionais indiquem que o prejuízo em não revelar supera muito o dano causado pela revelação desta informação confidencial (ver Cap. 20).

Como B.D. é portadora da síndrome do X frágil, ela pode voltar para levantar a questão de testar sua filha. A maioria dos geneticistas e consultores genéticos é contra os testes em crianças cuja idade ainda não permite que sejam capazes de dar uma permissão informada, pois isto interfere na autonomia e no direito confidencial da criança. Existem, entretanto, circunstâncias nas quais os testes podem ter benefícios médicos ou psicossociais imediatos para a criança e sua família, benefícios que superam o potencial prejuízo causado pelo teste.

DETERMINAÇÃO DOS RISCOS DE RECORRÊNCIA

A estimativa dos riscos de recorrência é uma preocupação central na consulta genética. Em termos ideais, ela é baseada no conhecimento da natureza genética do distúrbio em questão e no heredograma da família que está sendo informada. O membro da família cujo risco de um distúrbio genético está sendo determinado em geral é um parente de um probando, tal como um irmão de um filho afetado ou um filho vivo ou futuro de um adulto afetado. Em algumas famílias, especialmente para algumas características autossômicas dominantes e ligadas ao X, também pode ser necessário estimar o risco para parentes mais remotos.

Quando se sabe que um distúrbio tem herança monogênica, o risco de recorrência para membros específicos da família em geral pode ser determinado pelos princípios mendelianos discutidos no Cap. 5 (Fig. 19.2). Por outro lado, os cálculos de risco podem ser menos diretos se houver uma penetrância reduzida ou expressividade variável, ou se a doença em geral for resultante de mutação nova, tal como em muitos distúrbios ligados ao X e autossômicos dominantes. Os testes laboratoriais que dão resultados equivocados podem criar outras complicações. Nestas circunstâncias, as estimativas de risco mendeliano às vezes podem ser modificadas por meio da **análise bayesiana** do heredograma (ver mais adiante), que leva em conta informações sobre a família que podem aumentar ou diminuir o risco mendeliano prévio.

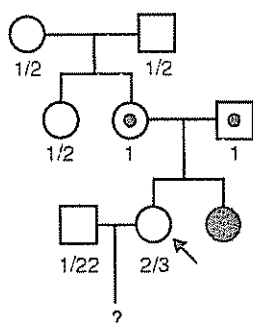



Fig. 19.2 Estimativa de risco mendeliano na informação genética A irmã da consulente é afetada por uma condição autossômica recessiva, neste exemplo fibrose cística (CF). O risco de outros membros da família serem portadores pode ser determinado por meio dos princípios mendelianos e é indicado no heredograma. O risco da consulente ter um filho afetado é de 2/3 × 1/22 × 1/4, ou menos de 1%

Em contraste com os distúrbios monogênicos, os mecanismos subjacentes de herança para a maioria dos distúrbios cromossômicos e características complexas são desconhecidos, e as estimativas do risco de recorrência são baseadas na experiência prévia (Fig. 19.3). Este enfoque é muito bom se existirem bons dados sobre a freqüência ou recorrência do distúrbio nas famílias e se o fenótipo não for heterogêneo. Entretanto, quando um fenótipo em particular tem um risco indeterminado ou pode resultar de uma variedade de causas com freqüências diferentes e riscos muito diferentes, a estimativa do risco de recorrência é muito arriscada. Em uma seção mais adiante consideraremos a estimativa do risco de recorrência em algumas situações clínicas típicas, tanto diretas como mais complicadas.

Estimativa de Risco Quando os Genótipos São Conhecidos

A estimativa mais simples de risco aplica-se às famílias nas quais os genótipos relevantes de todos os membros da família são conhecidos ou podem ser deduzidos. Por exemplo, quando se sabe que ambos os membros de um casal são portadores de uma condição autossômica recessiva e um está interessado em saber a chance que o casal tem de ter outro filho afetado, a probabilidade de risco de que a criança herde a doença é de um em quatro a

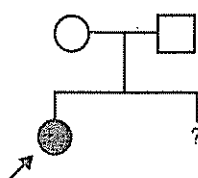



Fig. 19.3 Estimativa de risco empírico na consulta genética. Uma família sem outra história familiar positiva tem um filho afetado por um distúrbio conhecido como sendo multifatorial ou cromossômico. Qual o risco de recorrência? Se a criança for afetada por espinha bífida, o risco empírico de um filho subseqüente será de aproximadamente 4% (ver Cap. 15). Se a criança tiver síndrome de Down, o risco empírico de recorrência será de cerca de 1% se o cariótipo for de trissomia do 21, mas poderá ser substancialmente maior se um dos genitores for portador de uma translocação robertsoniana envolvendo o cromossomo 21 (ver Cap. 10)

cada gestação. Mesmo que o casal tenha tido seis filhos não-afetados depois do filho afetado, o risco da 8.ª, 9.ª ou 10.ª gestação ainda é de um em quatro para cada gestação.

Mesmo quando todos os genótipos relevantes não são completamente conhecidos, o risco de ser um portador pode ser estimado pela equação de Hardy-Weinberg (ver Cap. 7). Por exemplo, a chance de que um portador conhecido de fibrose cística (CF) possa ter um filho afetado depende da chance de que o parceiro seja um portador. O risco do parceiro ser um portador depende de sua origem étnica (ver os Caps. 6 e 7). Para a população caucasiana em geral, esta chance é de 1/22. Como a chance de que o filho de dois portadores seja homozigoto para o alelo mutante CF é de 1/4, a chance de que um portador conhecido e seu parceiro não-aparentado tenham o primeiro filho afetado é o produto destas probabilidades, ou 1/22 × 1/4 = 1/88 (cerca de 1%). Nesta discussão, supõem-se, logicamente, que não exista um modo de determinar se o outro parceiro é um heterozigoto para o locus em questão. Embora isto seja verdade para a maioria das condições autossômicas recessivas, a maioria (embora nem todos) dos portadores de CF pode ser prontamente identificada pelos testes de DNA.

Estimativa de Risco Quando São Possíveis Genótipos Alternativos

Em contraste com o caso simples anteriormente descrito, surgem situações nas quais os genótipos das pessoas relevantes na família definitivamente não são conhecidos. O risco de recorrência será muito diferente dependendo de o consulente ser um portador de um alelo anormal de um gene de doença. É óbvio que, se for possível testar diretamente o alelo mutante, a incerteza da condição de portador pode ser resolvida. Entretanto, em outras situações (felizmente cada vez menos, devido ao progresso em genética molecular), não podemos testar diretamente a condição de portador. A **análise bayesiana** (baseada no teorema de Bayes sobre probabilidade, publicado em 1763) é um método de uso da informação *fenotípica* em um heredograma para avaliar a probabilidade relativa de duas ou mais possibilidades alternativas. Por exemplo, se uma pessoa possui ou não um determinado alelo mutante. Alguns exemplos do uso da análise bayesiana para avaliação de risco em heredogramas são examinados nesta seção.

Heredogramas Ligados ao X

Para ilustrar o valor da análise bayesiana, considere os heredogramas mostrados na Fig. 19.4. Na família A, a mãe II-1 é uma **portadora obrigatória** de hemofilia A, pois seu pai era afetado. Seu risco de transmitir o gene da hemofilia é de 1/2, e o fato de ela já ter quatro filhos não-afetados *não* reduz seu risco. Assim, o risco da consulente (III-5) ser uma portadora é de 1/2, e o risco geral dela ter um filho afetado é de 1/2 (o risco dela ser portadora) × 1/2 (o risco de transmitir o gene) × 1/2 (a chance de ter um menino) = 1/8. Na família B, entretanto, a mãe da consulente (a pessoa II-2) pode ou não ser portadora, dependendo dela ter herdado o alelo A de hemofilia de sua mãe I-1. Se III-5 fosse a única prole de sua mãe, seu risco de ter um filho afetado seria de 1/2 (o risco de sua mãe ser uma portadora) × 1/2 (seu risco de herdar o alelo mutante de sua mãe) = 1/4 (25%), e seu risco de ter um filho afetado seria de 1/4 (seu risco de ser portadora) × 1/4 (seu risco de transmitir o gene para um filho afetado) = 1/16 (aproximadamente 6%). Sem poder testar III-5 diretamente quanto ao alelo mutante, não podemos dizer se ela é uma

	Hipótese 1	Hipótese 2
	II-2 É Portadora	*II-2 NÃO É Portadora*
Probabilidade *a priori*	1/2	1/2
Probabilidade condicional	$(1/2)^4 = 1/16$	1
Probabilidade conjunta	$1/2 \times 1/16 = 1/32$	$1/2 \times 1 = 1/2$
Probabilidade *a posteriori*	$\frac{1/32}{1/32 + 1/2} = 1/17$	$\frac{1/2}{1/32 + 1/2} = 16/17$

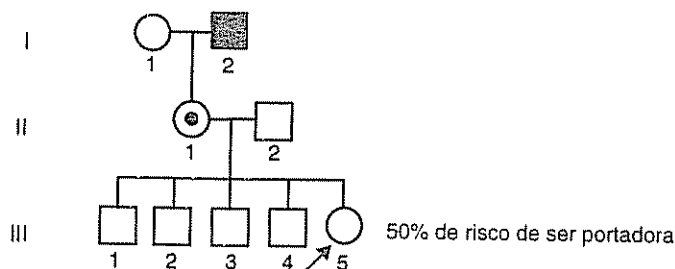
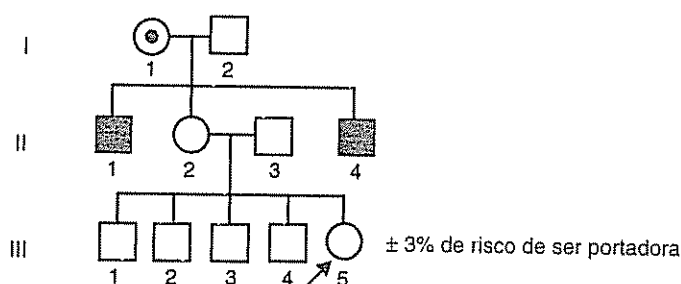



Fig. 19.4 Estimativa de risco modificada na informação genética. As consulentes nas duas famílias estão em risco de ter um filho com hemofilia A. Na família A, a mãe da consulente é uma heterozigota obrigatória. Na família B, a mãe da consulente pode ou não ser portadora. A aplicação da análise bayesiana reduz o risco de ser portadora para apenas cerca de 3% para a consulente da família B, mas não para a da família A. Ver o texto para o cálculo do risco modificado.

portadora. Neste caso, entretanto, o fato de III-5 ter quatro irmãos não-afetados é relevante. Podemos suspeitar que talvez sua mãe não seja portadora. Antes de sua reprodução, não existem informações adicionais de nenhum tipo para indicar se II-2 é ou não uma portadora. Como II-2 é filha de uma portadora, ambas as possibilidades são igualmente prováveis. A cada vez que II-2 tiver um filho, entretanto, a chance de que o filho não seja afetado será de apenas 1/2 se II-2 *for* uma portadora, embora seja quase certo (probabilidade = 1) que o filho não seja afetado se II-2 *não for* portadora. Como a cada filho que II-2 tiver ela será testada quanto à possibilidade de ser portadora, que a coloca com 50% de chance de ter um filho não-afetado, parece intuitivamente óbvio que, depois de ter quatro filhos não-afetados, suas chances de não ser portadora mudam a seu favor. A análise bayesiana nos permite levar em conta este tipo de informação indireta ao calcular se II-2 é ou não portadora, modificando assim os riscos da consulente ser uma portadora e ter um filho afetado. De fato, o risco da consulente ser uma portadora do gene de hemofilia é de apenas cerca de 3% em vez de 25%. Conseqüentemente, seu risco de ter um filho afetado é menor que 1% e não de 6%.

Como chegamos a estes dados para a família B? Para traduzir esta intuição em cálculo real de risco, usamos o cálculo bayesiano de probabilidade. Identifique uma hipótese alternativa e marque uma coluna (ver adiante) para cada hipótese. Em cada coluna, preencha os valores da probabilidade apropriada como segue. A "probabilidade *a priori*" é a chance inicial de cada hipótese estar correta sem saber nada sobre o heredograma da família. A "probabilidade condicional" em cada coluna é a probabilidade, na hipótese desta coluna, de que os eventos que você sabe que já ocorreram (os fatos que você obteve sobre o heredograma) possam ocorrer na suposição de que a hipótese no topo da coluna esteja correta. (As probabilidades condicionais em cada uma das colunas NÃO têm que somar 1, pois representam probabilidades de eventos que ocorrem em suposições muito diferentes e não cobrem todas as possibilidades.) A "probabilidade conjunta" é o produto das probabilidades *a priori* e condicional. Todas estas probabilidades diferentes nos permitem fazer o cálculo que queremos: a probabilidade relativa de uma hipótese *versus* a outra, levando em conta todas as informações condicionais disponíveis. Este cálculo é chamado de "probabilidade *a posteriori*", na qual uma probabilidade conjunta é comparada com a outra.

Na família B, precisamos primeiro determinar o risco de que sua mãe (II-2) seja portadora antes de calcular o risco modificado para a consulente (III-5). II-2 é a filha de uma portadora obrigatória do gene de hemofilia A. *Existem duas outras hipóteses alternativas*: II-2 *é* portadora ou II-2 *não é* portadora. Seu risco mendeliano de ser portadora (chamado de **probabilidade *a priori***) é de 1/2. A probabilidade *a priori* de que ela *não seja* portadora é, logicamente, também de 1/2. Fazemos duas colunas: II-2 é portadora e II-2 não é portadora.

Em seguida, consideramos as probabilidades de que todos os quatro filhos não-afetados tenham herdado um alelo normal no locus de fator VIII ligado ao X de sua mãe, considerando as duas situações hipotéticas: de que ela *é* portadora e de que ela *não é* portadora. Estas são chamadas de **probabilidades condicionais**. Se II-2 for portadora, a chance de que todos os quatro filhos não sejam afetados é de $(1/2)^4$, ou 1/16. Se, por outro lado, ela não for portadora, a probabilidade de que seus filhos não sejam afetados é essencialmente 1.

Em seguida, consideramos a **probabilidade conjunta**, que é o produto dos riscos *a priori* e condicional. A probabilidade conjunta, supondo-se que II-2 é portadora com quatro filhos normais, é de 1/2 (seu risco *a priori* de ser portadora) × 1/16 (o risco condicional de ter quatro filhos normais em tal caso), ou 1/32. A probabilidade conjunta, supondo-se que II-2 *não é* portadora, é de 1/2 × 1, ou 1/2.

Agora podemos calcular a **probabilidade *a posteriori*** de que II-2 seja portadora. Considerando que seus quatro filhos são normais, há uma chance de 1/32 de que ela seja portadora e uma chance de 1/2 de que ela não o seja. Portanto, a probabilidade *a posteriori*, expressa como uma fração de que II-2 seja portadora, é

$$\frac{1/32}{(1/2 + 1/32)} = 1/17$$

e a probabilidade final de que ela *não* seja portadora é de 16/17.

Finalmente, então, o risco da consulente ser portadora é a metade o risco de sua mãe, que é de 1/2 × 1/17 = 1/34, ou aproximadamente 3%. Assim, a aplicação do teorema de Bayes para modificar o risco mendeliano reduziu o risco *a priori* da consulente ser portadora de 25% para um risco final de apenas 3%.

Para cada filho adicional sem a doença nascido de II-2 na família B, a probabilidade de que III-5 seja portadora cai, não porque a distribuição independente dos cromossomos e as leis da herança mendeliana estejam mudando, mas porque a probabilidade conjunta, e, portanto, *a posteriori*, de que II-2 seja portadora está mudando. Similarmente, se III-5 também tiver filhos não-afetados, seu risco de ser portadora também poderá ser modificado para baixo usando-se um cálculo bayesiano. Se II-2 tivesse tido um filho afetado, seria comprovado que ela é portadora, e o risco de III-5 na família B seria o mesmo que é na família A = 1/2. Logicamente, se III-5 tivesse um filho afetado, então ela seria portadora, e a análise bayesiana não seria mais necessária, pois só haveria uma hipótese possível: III-5 é portadora.

A análise bayesiana pode parecer uma mera manobra estatística. Entretanto, a análise permite que os consultores genéticos quantifiquem o que parecia ser intuitivamente provável pela inspeção do heredograma: o fato da consulente ter tido quatro irmãos não-afetados apóia a hipótese de que sua mãe não é portadora. Uma vez feita a análise, o risco final de que III-5 seja portadora pode ser usado na consulta genética. O risco de que seu primeiro filho tenha hemofilia A é de 1/34 × 1/4, ou menos de 1%. O risco é apreciavelmente mais baixo que a probabilidade *a priori* estimada sem levar em conta a evidência genética dada por seus irmãos.

Casos Isolados de Distúrbios Ligados ao X

Como qualquer distúrbio grave ligado ao X se manifesta no homem hemizigoto, um caso isolado (sem história familiar) de tal distúrbio pode representar uma nova mutação gênica (na qual a mãe não é portadora) ou a herança de um alelo mutante de sua mãe portadora não-afetada (ignoramos a chance pequena, mas real, de mosaicismo para a mutação na mãe). Avaliar o risco de recorrência depende de conhecer a chance de que ela possa ser portadora. A análise bayesiana pode ser usada para avaliar os riscos de portadora de uma doença letal ligada ao X, tal como a distrofia muscular Duchenne (DMD) ou a deficiência de ornitina transcarbamilase (OTC).

Considere a família em risco de DMD mostrada na Fig. 19.5. Existem três explicações possíveis para os casos isolados de DMD, cada uma com estimativas de risco muito diferentes para a família:

A. A condição de III-1 pode resultar de uma mutação nova. Neste caso, nenhum de seus parentes femininos teria um risco significativo de ser portadora.

B. Sua mãe, II-1, é portadora, mas sua condição é o resultado de uma nova mutação. Neste caso, sua filha (III-2) tem um risco de 1/2 de ser portadora e sua neta (IV-I) tem um risco de 1/4. Nenhum dos outros parentes femininos teria um risco significativo.

C. Sua mãe herdou um alelo mutante da mãe dela (I-1), que também é portadora. Neste caso, todos os parentes femininos têm um risco de 1/2 ou de 1/4 de ser portadoras.

Cálculos Bayesianos para Mães de Casos Isolados de Distúrbios Letais Ligados ao X

	Hipótese 1	Hipótese 2
	II-1 É Portadora	*II-1 NÃO É Portadora*
Probabilidade *a priori*	4μ	$1 - 4\mu \approx 1$
Probabilidade condicional	1/2	μ
Probabilidade conjunta	$4\mu \times 1/2 = 2\mu$	$1 \times \mu$
Probabilidade *a posteriori*	$\frac{2\mu}{2\mu + \mu} = 2/3$	$\frac{\mu}{2\mu + \mu} = 1/3$

A probabilidade *a priori* de que cada mulher seja ou não portadora pode ser calculada sob suposições simples sobre a taxa de mutação, μ (ver Boxe).

Agora, a análise bayesiana pode ser aplicada.

Assim, a probabilidade final de que a mãe de um caso isolado de um distúrbio letal ligado ao X seja portadora é de 2/3, e a probabilidade correspondente de que o paciente represente uma mutação nova deve ser de 1/3. Estamos ignorando a possibilidade pequena, mas real, do mosaicismo germinativo nestes cálculos (ver Cap. 5).

Finalmente, a probabilidade de que a avó materna de um caso isolado (p. ex., ver I-1 na Fig. 19.5) seja portadora pode ser calculada de modo similar, exceto pelo fato de as probabilidades condicionais agora serem diferentes. Se I-1 for portadora, a probabilidade de ter um neto afetado é de 1/2 (a chance de que II-1 herde o alelo mutante) × 1/2 (a chance de que III-1 herde o alelo mutante) = 1/4. A probabilidade de ter um neto afetado se I-1 *não for* portadora é μ (uma nova mutação no ovócito que originou III-1) mais 1/2 (a chance de que III-1 herde um alelo mutante) × 2μ (a chance de que II-1 seja portadora por uma mutação nova em um dos gametas que lhe deu origem) = $\mu + 1/2 \times (2\mu) = 2\mu$. O risco de que

Suponha que f_{atual} seja a probabilidade de que qualquer mulher na geração atual seja portadora de um distúrbio letal ligado ao X. Então, f_{atual} é a chance de que ela herde um alelo mutante de sua mãe *mais* a chance de que ela receba um novo gene mutado de sua mãe *mais* a chance de que ela receba um novo gene mutado de seu pai. Se a taxa de mutação é a mesma em homens e mulheres, os últimos dois fatores são cada um equivalentes à taxa de mutação, μ, e o risco *a priori*, então, torna-se a chance de que ela herde um alelo mutante de sua mãe *mais* 2μ. A chance de que ela herde um alelo mutante de sua mãe é de $1/2 \times f_{anterior}$, a probabilidade de que qualquer mulher na geração anterior seja portadora de um distúrbio ligado ao X. Logo,

$$f_{atual} = (1/2 \times f_{anterior}) + 2\mu$$

Supondo-se que a freqüência da doença, f, não mude de uma geração para a seguinte ($f_{atual} = f_{anterior} = f$) a resolução de f nos dá $f = 4\mu$.

Cálculos Bayesianos para Avós de Casos Isolados de Distúrbios Letais Ligados ao X

	Hipótese 1	Hipótese 2
	I-1 É Portadora	*I-1 NÃO É Portadora*
Probabilidade *a priori*	4μ	$1 - 4\mu \approx 1$
Probabilidade condicional	1/4	2μ
Probabilidade conjunta	$4\mu \times 1/4 = \mu$	$1 \times 2\mu$
Probabilidade *a posteriori*	$\frac{\mu}{2\mu + \mu} = 1/3$	$\frac{2\mu}{2\mu + \mu} = 2/3$

Cálculos Bayesianos para um Distúrbio Autossômico Dominante com Penetrância Incompleta

	Hipótese 1	Hipótese 2
	III-4 É Heterozigota	*III-4 É Homozigota Normal*
Probabilidade *a priori*	1/2	1/2
Probabilidade condicional	3/10	1
Probabilidade conjunta	$1/2 \times 3/10 = 3/20$	$1/2 \times 1 = 1/2$
Probabilidade *a posteriori*	$\frac{3/20}{1/2 + 3/20} = 3/13$	$\frac{1/2}{1/2 + 3/20} = 10/13$

a avó I-1 na família mostrada na Fig. 19.5 seja portadora é, portanto, de 1/3 (Fig. 19.6).

Distúrbios com Penetrância Incompleta

Para avaliar o risco de recorrência dos distúrbios com penetrância incompleta, a probabilidade de que uma pessoa aparentemente normal seja portadora do gene mutante em questão deve ser considerada.

A Fig. 19.7 mostra um heredograma da deformidade da mão fendida, uma anomalia autossômica dominante com penetrância incompleta discutida no Cap. 5. Uma estimativa da penetrância pode ser feita a partir de um único heredograma, se ele for grande o suficiente, ou de uma revisão de heredogramas publicados. Usamos 70% em nosso exemplo.

O heredograma mostra várias pessoas que devem portar o gene mutante, mas não o expressam (nos quais o defeito não é penetrante): I-1 ou I-2 (supondo falta de mosaicismo somático ou germinativo) e II-3. Os outros membros familiares não-afetados podem ou não ter o gene mutante.

Se III-4 for a consulente, seu risco de ter um filho com deformidade da mão fendida pode ser avaliado do seguinte modo: primeiro, determine a chance de que III-4 seja portadora e então calcule a chance de ter um filho afetado.

Este cálculo significa que a probabilidade *a priori* de que a criança nascida de III-4 herde o alelo da deformidade da mão fendida = $1/2 \times 3/13 = 3/26$ e, se herdar, a probabilidade do alelo anormal ser penetrante = 7/10, levando ao risco final de que III-4 tenha um filho afetado pela deformidade da mão fendida = $3/26 \times 7/10 \approx 8\%$.

Distúrbios com Idade Tardia de Manifestação

Muitas condições autossômicas dominantes apresentam caracteristicamente uma idade tardia de manifestação, além da idade reprodutiva. Assim, não é raro na consulta genética perguntar se uma pessoa em idade reprodutiva em risco de um determinado distúrbio autossômico dominante possui ou não o gene. Um exemplo de tal distúrbio é uma forma familiar rara de doença de Parkinson (PD) herdada como uma condição autossômica dominante.

Considere o heredograma de PD na Fig. 19.8, na qual o consulente, um homem assintomático de 35 anos, quer saber seu risco para PD. Seu risco *a priori* de ter herdado o gene de PD de sua avó afetada é de 1/4. Considerando que talvez apenas 5% das pessoas com esta forma rara de PD tenham sintomas nesta idade, ele não deveria apresentar sintomas da doença, mesmo que tivesse herdado o alelo mutante. O aspecto mais significativo do heredograma, entretanto, é que o pai do consulente (II-2) também é assintomático aos 60 anos, uma idade na qual talvez dois terços das pessoas com esta forma de PD apresentam sintomas e um terço, não.

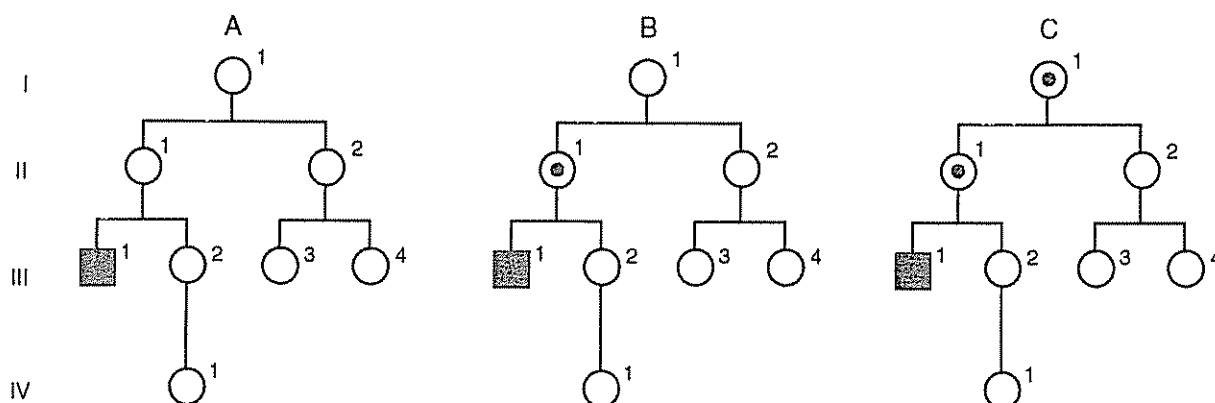



Fig. 19.5 Três explicações possíveis para a ocorrência de um caso isolado de distrofia muscular Duchenne (DMD): *A*. O menino afetado pode ter um novo gene mutante; *B*. Sua mãe pode ser portadora devido a um novo gene mutante; ou *C*. tanto sua mãe quanto sua avó podem ser portadoras. A determinação de qual explicação é a correta tem implicações significativas para estimar os riscos dos outros parentes do menino

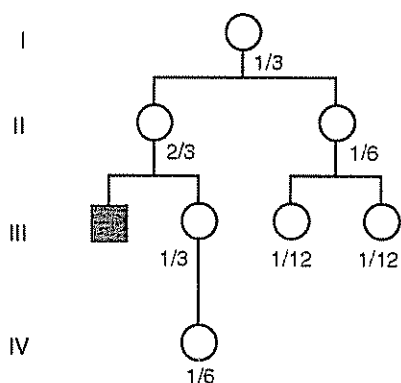
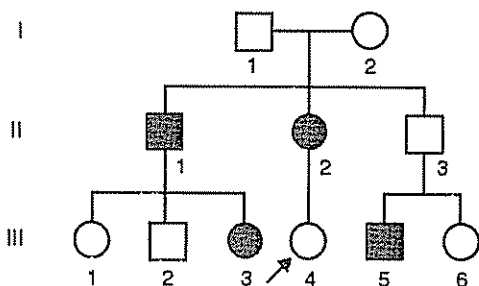



Fig. 19.6 Estimativas gerais de risco de portadora para as mulheres da família retratada na Fig 19 5 Estas estimativas de risco. baseadas em fundamentos genéticos. podem ser modificadas mais tarde. quando se considerar a informação obtida a partir da história familiar, o teste de detecção de portadoras ou os métodos genéticos moleculares para a detecção direta da mutação no menino afetado. usando cálculos bayesianos

Como freqüentemente é feito na análise bayesiana, não calculamos imediatamente o risco do consulente. Em vez disso, voltamos a uma geração anterior, fazemos os cálculos para um ancestral e usamos este cálculo como base para uma probabilidade *a priori* para o consulente.

Cálculo Bayesiano para Distúrbios com Idade Tardia de Manifestação

	Hipótese 1	**Hipótese 2**
	II-2 É Heterozigota	*II-2 NÃO É Heterozigota*
Probabilidade *a priori*	1/2	1/2
Probabilidade condicional	1/3	1
Probabilidade conjunta	1/2 × 1/3 = 1/16	1/2
Probabilidade *a posteriori*	$\frac{1/16}{1/6 + 1/2} = 1/4$	$\frac{1/2}{1/6 + 1/2} = 3/4$

De acordo com a análise bayesiana, o risco do *pai* ter o gene *PD*, considerando que ele é assintomático aos 60 anos, é de 1/4. Usando esta informação, podemos modificar o risco do consulente ter herdado o gene *PD* para 1/2 × 1/4 = 1/8 ou 12,5%. Como a penetrância é de apenas aproximadamente 5% aos 35 anos, o fato de o consulente ser assintomático tem muito pouco efeito e diminui seu risco de portar o gene *PD* para cerca de 11,5%. Se ele vai desenvolver a doença e em que idade, depende do conhecimento da penetrância específica para a idade deste distúrbio. Por exemplo, sua chance de desenvolver a doença aos 60 anos é de 2/3 × 11,5% = 7,7%.

Fornecer estes riscos de recorrência na consulta genética requer um cuidadoso acompanhamento. Se, por exemplo, o consulente ou seu pai fossem desenvolver os sintomas da PD, os riscos mudariam muito.

Riscos Empíricos de Recorrência

Os consultores genéticos lidam com muitos distúrbios que não são monogênicos. Em vez disso, os consultores podem ser chamados para dar estimativas de risco de distúrbios complexos com um forte componente genético e aglomeração familiar, tais como fenda labial e palatina, doença cardíaca congênita e meningomielocele (ver Quadros 15.8, 15.9 e 15.10 no Cap. 15). Nestas situações, o risco de recorrência nos parentes em primeiro grau das pessoas afetadas pode estar aumentado em relação à incidência populacional da doença, mas não no nível esperado para os distúrbios autossômicos dominantes ou recessivos. Nestas situações, os riscos de recorrência são estimados empiricamente estudando-se tantas famílias com o distúrbio quanto possível e observando-se com que freqüência ocorre a recorrência do distúrbio. A freqüência observada de uma recorrência é considerada o **risco empírico de recorrência**.

Os consultores genéticos devem ter cautela ao aplicar dados de risco empírico a uma família em particular. Primeiro, as estimativas empíricas são uma média do que indubitavelmente é um grupo de distúrbios heterogêneos com diferentes mecanismos de herança. Em qualquer família, o risco real de recorrência pode de fato ser maior ou menor que a média. Segundo, as estimativas de risco empírico usam a história para fazer previsões sobre as futuras ocorrências. Se as causas biológicas subjacentes estão mudando ao longo do tempo, os dados do passado podem não ser precisos para o futuro. Finalmente, os dados são derivados de uma determinada população, e assim os dados de um grupo étnico, uma classe socioeconômica ou um local geográfico podem não ser precisos para uma pessoa de um grupo diferente. Entretanto, tais dados são úteis quando os pacientes perguntam ao consultor qual

Fig. 19.7 Heredograma de uma família com deformidade da mão fendida e falta de penetrância O risco da consulente ter um filho clinicamente afetado pode ser calculado como sendo de aproximadamente 8% Para discussão. ver o texto

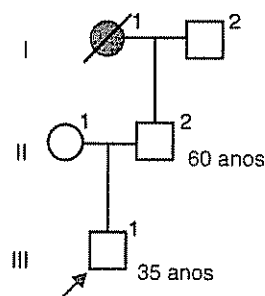



Fig. 19.8 Riscos modificados para idade na informação genética de PD dominante O fato de o pai do consulente ser assintomático aos 60 anos reduz o risco final do consulente ter o gene para aproximadamente 12.5% O consulente ser assintomático reduz apenas um pouco o risco. pois a maioria dos pacientes que têm o alelo mutante para este distúrbio ainda será assintomática aos 35 anos

a melhor estimativa do risco de recorrência para distúrbios de herança complexa.

Por exemplo, os defeitos de tubo neural (NTDs) (mielomeningocele e anencefalia) ocorrem em aproximadamente 0,3% dos nascimentos na população caucasiana dos EUA. Se, entretanto, um casal tem um filho com um NTD, o risco na próxima gestação é de 4% (13 vezes maior) (ver Quadro 15.8). Se estes dados de risco são calculados para sexos diferentes, os dados são ainda mais marcantes: a irmã de uma menina com um NTD tem uma chance de 6% de também ter um NTD. Os riscos permanecem elevados em comparação com o risco da população em geral para parentes mais distantes: um parente em segundo grau (tal como um sobrinho ou sobrinha) de uma pessoa com um NTD tem uma chance de 1,7% de ter um defeito de nascimento similar. Com suplementação de folato antes da concepção e durante o início da gestação, entretanto, estes dados de risco de recorrência caem muito (ver Cap. 15).

Informação Genética para Consangüinidade

Os casais consangüíneos às vezes pedem uma consulta genética antes de terem filhos porque é amplamente divulgado um aumento de risco de defeitos de nascimento nas proles desses casais. Dois pontos principais devem ser explicados a tais casais. Primeiro, o risco relativo de prole anormal é maior para genitores aparentados do que para não-aparentados, mas ainda é bem baixo: os dados de risco básico para qualquer anomalia é de 3% para qualquer filho de quaisquer genitores, e o risco aumenta apenas um pouco, para aproximadamente 4,5% a 5%, para a prole de primos em primeiro grau. Este aumento de risco não é exclusivo para distúrbios monogênicos autossômicos recessivos, mas inclui todo o espectro de distúrbios monogênicos e características complexas. Segundo, qualquer casal, consangüíneo ou não, que tem um filho com um distúrbio autossômico recessivo enfrenta um risco de recorrência de 25% em suas futuras gestações, independente de qual fosse seu risco antes de ter um filho afetado. Este risco aplica-se, logicamente, apenas à prole do mesmo casal. Como ambos os genitores de filhos afetados devem ser portadores, e como os portadores são raros em comparação com os homozigotos normais, um genitor de um filho com um distúrbio autossômico recessivo tem menos probabilidade de ter outro filho afetado com um parceiro diferente, dependendo da freqüência de portadores.

Aplicação da Genética Molecular à Determinação dos Riscos de Recorrência

Muitos genes de doença agora podem ser detectados diretamente em portadores e pessoas afetadas por meio da análise do DNA. Isto representa uma grande melhora na detecção de portadores e do diagnóstico pré-natal, permitindo, em muitos casos, a determinação da presença ou ausência de um determinado gene com essencialmente 100% de precisão.

Existem dois enfoques principais para a estimativa de risco pela análise de DNA. O primeiro método é pela **detecção direta da mutação**, usando o gene, cDNA ou sondas sintéticas para detectar uma mutação no DNA genômico do paciente ou outro membro da família. Como descrito no Cap. 4, tais métodos são rápidos, precisos e relativamente não-invasivos. É óbvio que os testes diretos podem ser usados apenas quando a mutação (ou mutações) responsável(eis) por um determinado distúrbio é conhecida. O segundo é o método de usar **marcadores proximamente ligados**, de preferência marcadores flanqueadores do gene (ver Cap. 8). Este método é indireto, mas funciona bem se as exigências relativamente rígidas que se seguem puderem ser atendidas:

1. Há uma ligação próxima entre a mutação e o marcador, de modo que a recombinação é improvável.
2. A família é "informativa", isto é, membros cruciais da família estão disponíveis para o estudo e são heterozigotos para os marcadores.
3. A fase de ligação é conhecida ou pode ser razoavelmente deduzida.
4. Não ocorreu recombinação entre os marcadores acompanhados e o gene da doença.

Em casos favoráveis, pelo menos alguma informação pode ser obtida para modificar o risco de alguns membros da família serem portadores da mutação em questão.

Detecção Direta das Mutações

Análise de Deleção na Distrofia Muscular Duchenne

Cerca de 60% dos pacientes com DMD têm deleções no gene (ver Cap. 12), e muitas destas deleções podem ser detectadas por transferência de Southern com uma série de sondas de cDNA ou por um conjunto de reações em cadeia da polimerase destinadas a amplificar as partes do gene deletadas com mais freqüência nas pessoas afetadas (ver Fig. 12.18). No heredograma mostrado na Fig. 19.9A, se o paciente com DMD (II-4) tivesse uma deleção identificável, o DNA do feto (obtido por métodos descritos no Cap. 18) poderia ser examinado diretamente quanto à presença ou ausência da deleção, e poderia ser feito um diagnóstico com certeza. Outro modo valioso para identificar deleções é quando a sonda detecta um fragmento de restrição que é formado pela junção de dois segmentos de DNA em ambos os lados da deleção. Tais fragmentos em geral são alterados em tamanho em comparação com o fragmento normal e, portanto, são diagnósticos do alelo da deleção.

No momento, a detecção de uma deleção em uma mulher heterozigota (III-1 na Fig. 19.9A) é desafiadora, mas factível, porque a ausência do segmento deletado é obscurecida pelo cromossomo normal não-deletado. Entretanto, encontrar um fragmento de junção com uma banda mudada é diagnóstico de um heterozigoto para uma deleção. Na ausência de um fragmento de junção, a identificação do gene mutante em membros da família da mulher em geral ainda é feita pelo uso de marcadores ligados (ver Fig. 19.9B).

Detecção de Mutações na Fibrose Cística

A maioria das mutações na CF é de mutações de uma só base ou deleções ou duplicações de um pequeno número de nucleotídeos (ver Cap. 12). A detecção de portadores e o diagnóstico pré-natal na CF usa uma enorme quantidade de informações que se acumularam dos tipos de mutações que causam a doença. Mais de 900 mutações diferentes foram descritas neste gene. Algumas são raras, ocorrendo em apenas algumas famílias. Outras são muito mais comuns, mas sua freqüência pode variar muito em grupos étnicos diferentes. Como foi discutido no Cap. 12, em pessoas descendentes do leste europeu, cerca de 70% das mutações CF são devidas a uma deleção de três pares de bases que remove a fenilalanina na posição 508 ($\Delta F508$). A mutação $\Delta F508$

A

Portadora

Previsto como não-afetado

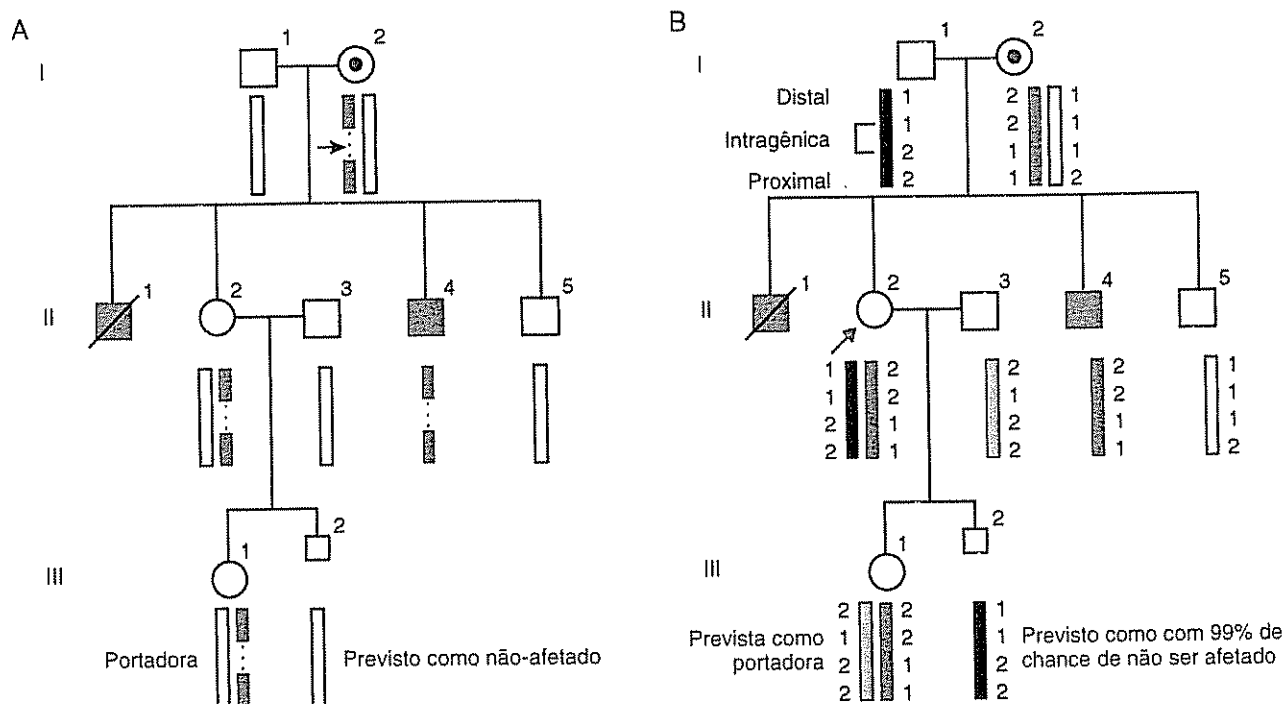



Fig. 19.9 Uso da detecção direta de mutação e análise de ligação genética para consulta genética em uma família com DMD *A*. O probando tem uma mutação de deleção indicada pela barra vermelha interrompida Os genes *DMD* normais são representados por barras vazadas. *B*. A mutação do probando é desconhecida Foram testados quatro marcadores polimórficos. dois dentro do gene *DMD* e um de cada lado. flanqueando-o A freqüência geral de recombinação entre os marcadores mais distantes é de 5% São mostrados os haplótipos observados na família O haplótipo indicado em vermelho contém o alelo *DMD* mutante Os genótipos previstos da filha do consulente e do feto masculino são baseados nos dados de DNA

é menos comum, ou mesmo totalmente ausente, em outros grupos étnicos, nos quais outras mutações que não a $\Delta F508$ são mais freqüentes. À medida que mutações adicionais em pacientes diferentes foram identificadas, os laboratórios começaram a oferecer uma bateria de testes para detecção de mutação nos quais dúzias das mutações mais comuns em uma população podem ser identificadas. A reação em cadeia da polimerase e a hibridização com oligonucleotídeos específicos para cada mutação são usadas para identificar fetos heterozigotos portadores e homozigotos afetados fácil e rapidamente. Para a minoria das famílias nas quais as mutações são desconhecidas, os marcadores de DNA proximamente ligados ao locus de CF estão disponíveis para diagnóstico por análise de ligação.

Aplicação de Marcadores Ligados ao Diagnóstico Molecular

O primeiro polimorfismo de DNA aplicado ao diagnóstico clínico foi um polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição em 3′ do gene de β-globina usado para diagnosticar casos de doença falciforme por análise de ligação (ver Fig. 11.7). Embora a distância entre o sítio polimórfico e o sítio da mutação falciforme no gene de β-globina fosse tão pequeno que tornou desprezível a freqüência de recombinação entre eles, é importante reconhecer que o enfoque de ligação para detecção da mutação é *indireto*, mesmo quando se usam polimorfismos informativos no gene que é responsável por um defeito genético O uso de um marcador ligado para rastrear a herança de um gene mutante tem um risco de recombinação entre o marcador genético e a mutação. Na maioria dos casos, o risco provavelmente é muito baixo. Genes muito grandes, tais como o gene *DMD*, fornecem exceções a esta generalização porque o crossing over dentro do gene ocorre em uma freqüência detectável. Na Fig. 19.10, mostramos o uso de genes clonados como marcadores polimórficos para o diagnóstico da doença, usando como exemplo a β-talassemia. Os exemplos ilustram, novamente, a necessidade de que um marcador genético seja informativo e que seja possível identificar a fase, de modo a fazer a análise de ligação.

A precisão do diagnóstico usando marcadores geneticamente ligados com uma apreciável freqüência de recombinação entre o marcador e o locus da doença pode ser muito aumentada usando-se dois marcadores genéticos informativos flanqueadores do gene da doença. Neste caso, a chance de um diagnóstico errado é reduzida significativamente, pois só ocorrerá um diagnóstico errado se ocorrerem *dois* crossings, um de cada lado do gene da doença. Por exemplo, para marcadores flanqueadores, cada um apresentando 10% de recombinação com o gene da doença, o diagnóstico de ligação genética será 99% preciso (em vez de 90% para um único marcador) O benefício de usar marcadores flanqueadores reforça o valor de um mapa de ligação genética preciso, com marcadores bem mapeados de ordem e distância conhecida.

Análise de Ligação na Distrofia Muscular Duchenne. O heredograma hipotético de DMD mostrado na Fig. 19.9B ilustra o uso de marcadores ligados para detectar um portador e para diagnosticar um feto na fase pré-natal. Nesta família, a avó materna I-2 é claramente portadora, pois ela teve dois filhos afetados. Ela é informativa para marcadores de DNA que são flanqueadores do gene *DMD* (e que são conhecidos como tendo cerca de 5% de chance de recombinação) e para um dos dois marcadores dentro deste grande gene. A fase de ligação na avó ma-

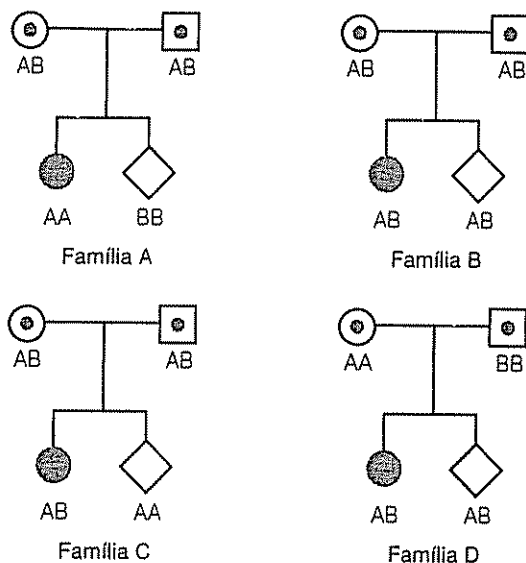



Fig. 19.10 Exemplos de diagnóstico molecular na β-talassemia, com polimorfismos no locus de β-globina. Supõem-se que a chance de recombinação entre o marcador polimórfico e a mutação seja desprezível. Na família A, a fase pode ser determinada pelo irmão afetado, e é possível um diagnóstico de não-afetado. Na família B, a fase não pode ser totalmente determinada. Não é possível nenhum diagnóstico, pois a segunda criança poderia ser afetada (chance de 50%) ou não-afetada (chance de 50%). Na família C, a fase não pode ser completamente determinada, mas é possível dar um diagnóstico de que o segundo filho será um portador heterozigoto não-afetado. Na família D, não é possível nenhum diagnóstico. A família não é informativa.

terna pode ser deduzida por seus dois filhos vivos II-4 e II-5, pois qualquer fase além desta indicada na Fig. 19.9B necessitaria de dois eventos de recombinação (nas meioses que levaram a seus dois filhos vivos). A consulente II-2 herdou o mesmo haplótipo materno que seu irmão afetado. Os marcadores de seu pai I-1 são conhecidos, e ela é informativa em todos os quatro loci. Sua fase de ligação é conhecida com certeza, e, portanto, seu risco de transmitir o haplótipo afetado para sua prole pode ser determinado. O risco de uma recombinação dupla ocorrendo na meiose na consulente, que lhe permitiria transmitir o gene *DMD* de sua mãe com os marcadores flanqueadores de seu pai, é menor que 1%; logo, a probabilidade de que o feto III-2 não seja afetado é maior que 99%. Além disso, como os marcadores do marido da consulente são conhecidos, pode-se prever que sua filha III-1 tenha herdado o gene *DMD* e seja portadora.

Estimativas de Risco Quando o Gene Não Foi Identificado

Os exemplos dados destacam duas condições relativamente comuns para as quais o gene responsável foi clonado e amplamente caracterizado. Nestas condições, muitas mutações foram diretamente analisadas, e muitos polimorfismos de DNA estão disponíveis para se fazer uma análise genética quando a detecção direta não é possível. Em outros distúrbios, entretanto, o gene para o qual uma determinada família está em risco ainda não foi identificado. Nestes casos, o papel dos serviços diagnósticos de DNA é um pouco mais complicado e caro. Mesmo quando a localização cromossômica de um gene é conhecida com alguma precisão devido a estudos de ligação bem-sucedidos (ver Cap. 8), pode haver uma incerteza considerável sobre as distâncias genéticas exatas entre o gene da doença e os marcadores de DNA ligados usados para o diagnóstico. Pode também haver alguma incerteza quanto à possível heterogeneidade de locus. A determinação da estimativa de risco com a finalidade de dar uma informação genética precisa pode envolver amplos estudos de muitos membros familiares com muitas sondas de DNA diferentes, na tentativa de colher informações definitivas sobre a localização, a fase e a presença de possíveis eventos de recombinação. Esta tarefa, entretanto, está se tornando cada vez menos pesada, pois o Projeto do Genoma Humano fornece cada vez mais mapas físicos e genéticos detalhados e densos.

CONCLUSÃO

No futuro, à medida que a base dos conhecimentos da genética médica se expandir, o escopo da informação genética aumentará proporcionalmente. Para os médicos, o desafio é apreciar a importância da consulta genética na prática médica, para compreender sua base científica e estar ciente das limitações de nossos conhecimentos. Para citar Sir William Osler, que escreveu em um contexto clínico, mas poderia muito bem estar discutindo riscos genéticos: "Os erros de julgamento podem ocorrer na prática de uma arte que consiste amplamente em balancear probabilidades."

Referências Gerais

Andrews L, Fullarton J, Holtzman N, Motulsky A (1994) Institute of Medicine. Assessing Genetic Risks: Implications for Health and Social Policy. National Academy Press, Washington DC.

Baker DL, Schuette JL, Uhlmann WR (1998) A Guide to Genetic Counseling. John Wiley, New York.

Bennett RL, Steinhaus KA, Uhrich SB, et al (1995) Recommendations for standardized pedigree nomenclature. J Genet Counsel 4:267–279.

Burnard P (1994) Counseling Skills for Health Professionals, 2nd ed. Singular Pub Group, London.

Clarke A (ed) (1994) Genetic Counseling: Practice and Principles. Routledge Press, New York.

Croyle R (ed) (1995) Psychosocial Effects of Screening for Disease Prevention and Detection. Oxford University Press, Oxford, England.

Emery AEH, Pullen I (eds) (1984) Psychological Aspects of Genetic Counseling. Academic Press, London.

Gardner RJM, Sutherland GR (1996) Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, England.

Harper PS (1998) Practical Genetic Counseling, 5th ed. Butterworth-Heinemann Medical, Oxford, England.

Kessler S (1979) Genetic Counseling: Psychological Dimensions. Academic Press, London.

Mahowald MB, Verp MS, Anderson RR (1998) Genetic counseling: Clinical and ethical challenges. Annu Rev Genet 32: 547–549.

Marteau T, Richards M (eds) (1996) The Troubled Helix: Social and Psychological Implications of the New Human Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Marks JH, Heimler A, Reich E, Wexler NS (1990) Genetic Counseling Principles in Action: A Casebook. (Birth Defects) Original Article Series 25(5), March of Dimes Birth Defects.

URLs para Recursos da Web Relacionados à Informação Genética

The Genetic Alliance

An international organization of consumers, professionals, laboratories, hospitals, companies, and not-for-profit foundations dedicated to improving the life of people affected by genetic disease

www.geneticalliance.org/

GeneClinics
A website supported by the Federal government and maintained by the University of Washington and Seattle Children's Hospital providing information on diagnosis, management, and counseling for specific disorders
www geneclinics org/

OMIM-Online Mendelian Inheritance in Man
Online database of human genes and genetic diseases maintained by the Johns Hopkins University School of Medicine and supported by the National Library of Medicine, National Institutes of Health
www3 ncbi,nlm nih gov/Omim/

Problemas

1. Você é consultado por um casal, Dorothy e David, que conta a seguinte história: o avô materno de Dorothy, Bruce, teve cegueira noturna estacionária, que também afetou o tio materno de Bruce, Arthur. Em outras palavras, a história familiar parece se ajustar a um padrão ligado ao X. (Há também uma forma autossômica dominante.) Dorothy e David têm três filhos não-afetados: uma filha, Elsie, e dois filhos, Edward e Eliot. Elsie está planejando ter filhos em um futuro próximo. Dorothy está pensando se deve previnir Elsie sobre o risco dela ser portadora de um grave distúrbio ocular. Desenhe o heredograma e responda o seguinte:
   (a) Qual a chance de que Elsie seja heterozigota?
   (b) Um oftalmologista registra a história familiar em mais detalhes e descobre evidências de que neste heredograma o distúrbio não é ligado ao X, mas sim autossômico dominante. Não há evidência de que a mãe de Dorothy, Cecile, seja afetada. Com base nisto, qual a chance de que Elsie seja heterozigota?

2. Um menino falecido, Nathan, era o único membro desta família com DMD. Ele tem duas irmãs vivas, Norma (que tem uma filha, Olive) e Nancy (que tem uma filha, Odette). Sua mãe Molly tem duas irmãs, Maud e Martha. Martha tem dois filhos não-afetados e duas filhas, Nora e Nellie. Maud tem uma filha, Naomi. Não há testes de portadora disponíveis porque a mutação no menino afetado permanece desconhecida.
   (a) Desenhe o heredograma e calcule os riscos posteriores para todas estas mulheres, usando as informações dadas neste capítulo.
   (b) Em muitos laboratórios de diagnóstico molecular, o diagnóstico pré-natal por análise de DNA só está disponível para mulheres com mais de 2% de risco de que a gestação resulte em um filho com DMD. Qual destas mulheres não se habilitaria?

3. Em uma cidade de Gales, em 1984, 13 meninos nasceram sucessivamente antes que nascesse uma menina. Qual a probabilidade de 13 nascimentos masculinos sucessivos? A probabilidade de 13 nascimentos sucessivos de um dos sexos? Qual a probabilidade de que após 13 nascimentos masculinos o 14.° seja um menino?

4. Seja H a freqüência populacional de portadores de hemofilia A. A incidência da hemofilia A nos homens (I) é igual a chance de que o gene materno *F8* tenha uma nova mutação (μ) *mais* a chance de que tenha uma mutação preexistente ($1/2H$). Assim, $I = \mu + 1/2H$. A hemofilia A tem uma adaptabilidade (f) de ± 0,70, ou seja, os hemofílicos têm ± 70% tantos filhos quanto os controles. H é então a chance de que um portador herde a mutação de um pai afetado ($I \times f$) *mais* a chance de uma nova mutação paterna (μ) *mais* a chance de herdá-la de sua mãe. $H = If + \mu + \mu + 1/2\,H$.
   (a) Para a hemofilia A, qual a incidência de homens afetados? E de mulheres afetadas? (As respostas das partes [a] e [b] em termos de múltiplos da taxa de mutação.) Se uma mulher tem um filho com um caso isolado de hemofilia A, qual o risco relativo de que ela seja portadora? Qual a chance de que seu próximo filho seja afetado?
   (b) Para DMD, $f = 0$. Qual a freqüência populacional de homens afetados? E de mulheres afetadas?
   (c) O daltonismo é tido como tendo uma adaptabilidade normal ($f = 1$). Qual a incidência de mulheres portadoras se a freqüência de homens daltônicos é de 8%?

5. Faça a correspondência dos termos na seção B com as explicações ou definições na seção A.

	A		B
a	A probabilidade de que qualquer mulher na população seja portadora de DMD	______	Consulente
b.	Teste de portadora na irmã de um menino com uma duplicação parcial no gene de fator VIII.	______	2/3
c.	Usados com marcadores de DNA como enfoque para a avaliação de estimativa de risco.	______	Heterozigota obrigatória
d.	Detecção de mutação por oligonucleotídeos alelo-específicos.	______	Probabilidade *a priori*
e.	O risco mendeliano de que uma pessoa seja portadora de um determinado distúrbio.	______	Mutação sem sentido no gene de fibrose cística
f.	A pessoa que procura ou recebe informação genética.	______	Detecção direta de uma mutação por transferência de Southern
g.	Uma pessoa que, com base na história familiar deve ser heterozigota.	______	Família informativa
h.	A probabilidade de que a mãe de um caso isolado de DMA seja portadora	______	4μ
i.	Uma família na qual os marcadores ligados a um locus de interesse permitem que uma mutação seja rastreada na família	______	Parente em 1.° grau
j	Genitor, irmão ou prole (mas não um gêmeo monozigótico)	______	Análise de ligação

6. Ira e Margie têm cada uma um irmão afetado por CF.
   (a) Quais seus riscos a *priori* de serem portadoras?
   (b) Qual o risco de terem um filho afetado em *qualquer* gestação?
   (c) Eles tiveram três filhos não-afetados e agora querem saber seu risco de ter um filho afetado. Usando a análise bayesiana para levar em consideração que já tiveram três filhos não-afetados, calcule a chance de que seu próximo filho seja afetado.

7. Uma mulher de 30 anos com distrofia miotônica vem para uma informação genética. Seu filho, com 14 anos, não apresenta sintomas, mas ela quer saber se ele será afetado por esta condição autossômica dominante mais tarde na vida. Aproximadamente metade das pessoas que têm o gene mutante são assintomáticos antes dos 14 anos. Qual o risco de que o filho eventualmente desenvolva distrofia miotônica? Você deveria testar o filho quanto a uma repetição expandida no gene para distrofia miotônica?

8. Um casal chega à sua clínica com seu filho de 7 meses, que tem um retardo de desenvolvimento moderado desde o nascimento. O casal está pensando em ter outros filhos e lhe pergunta se isto pode ser um distúrbio genético.
   (a) Isto é possível, e, caso sim, que padrão ou padrões de herança se ajustariam a esta história?
   (b) Ao colher uma detalhada história familiar, você descobre que ambas as famílias dos genitores são originalmente da mesma cidade no nordeste da Itália. Como este fato altera sua avaliação do caso?
   (c) Em seguida você toma conhecimento de que a mãe tem duas irmãs e cinco irmãos. Ambas as irmãs têm filhos com retardo de desenvolvimento. Como isto altera sua avaliação do caso?

9. Você comparece a uma reunião de pais da Associação de Neurofibromatose. Uma mulher gravemente afetada, com 32 anos de idade, comenta que ela não corre o risco de transmitir o distúrbio porque seus pais não são afetados e sua neurofibromatose, portanto, é devida a uma mutação nova. Comente.

Genética e Sociedade

A meta da genética médica é melhorar a saúde e o bem-estar das pessoas, suas famílias, suas comunidades e da sociedade. Neste capítulo, ampliaremos a discussão da genética médica além do paciente individual e sua família e examinaremos o papel da genética na sociedade como um todo. A aplicação dos testes de genética médica a um grupo étnico ou a uma população inteira já está ocorrendo em algumas circunstâncias selecionadas. Com as informações obtidas a partir do Projeto do Genoma Humano, podemos antecipar que a tecnologia da genética médica, particularmente nas áreas de testes e triagem de distúrbios hereditários e predisposição genética, terá um impacto ainda maior na saúde e no bem-estar da população como um todo. Por outro lado, os valores éticos e as preocupações sociais podem ajudar a moldar a forma como os conhecimentos de genética médica serão aplicados, de modo a maximizar os benefícios e minimizar qualquer prejuízo.

TRIAGEM POPULACIONAL DE DOENÇAS GENÉTICAS

A **triagem populacional** é um método baseado na população para identificar pessoas com determinados genótipos que se sabe que estão associados a uma doença genética ou a uma predisposição para uma doença genética. O distúrbio que é o alvo da triagem pode afetar as pessoas que estão sendo triadas ou seus descendentes. A triagem em nível populacional não deve ser confundida com os testes de pessoas afetadas ou portadoras dentro das famílias já identificadas devido a uma história familiar. Ao contrário, o objetivo da triagem populacional é examinar todos os membros de uma determinada população, independente de sua história familiar. A triagem genética é uma atividade de saúde pública importante, que se tornará mais significativa à medida que mais e melhores testes estiverem disponíveis para doenças hereditárias e para outras condições com um componente genético identificável.

Triagem de Neonatos

Os mais conhecidos esforços de saúde pública na genética são os programas do governo que fazem triagem populacional de todos os neonatos para identificar crianças com distúrbios genéticos para os quais um tratamento iniciado bem cedo pode evitar, ou pelo menos atenuar, as conseqüências. A determinação da adequação e da efetividade de custos da triagem neonatal para qualquer condição em particular em geral se baseia em critérios similares aos citados no Quadro 20.1.

A validade do resultado dos testes é particularmente importante. Resultados falso-positivos causam uma preocupação desnecessária aos pais, enquanto resultados falso-negativos prejudicam todo o objetivo do programa.

Duas condições herdáveis satisfazem claramente todos estes critérios: a fenilcetonúria (PKU) e a galactosemia. O protótipo de tais distúrbios é a PKU. A triagem neonatal rotineira para PKU é determinada por lei em todos os estados dos EUA com exceção de um e em quase todos os países desenvolvidos. A triagem para galactosemia é menos comum. (A triagem para hipotireoidismo congênito, um distúrbio que em geral não é genético mas é tratável, também é rotineira em muitos países.) Vários outros distúrbios, tais como a anemia falciforme, a deficiência de biotinidase a hiperplasia adrenal congênita e várias outras anomalias do metabolismo de aminoácidos, raramente estão incluídos nos programas de triagem neonatal porque sua incidência é menor ou porque um tratamento totalmente efetivo não está disponível. A triagem não é feita para muitas outras condições para as quais é possível porque sua incidência é muito baixa ou não há um método efetivo de tratamento.

Nem todos concordam que a triagem deva ser feita apenas para as condições altamente tratáveis. Tem sido questionado, por exemplo, que a triagem neonatal para fibrose cística (CF) beneficiaria o neonato, pois permitiria a instituição de tratamento para insuficiência pancreática ainda com o neonato relativamente bem antes do início da má absorção, da falta de desenvolvimento e

QUADRO 20-1

Critérios para Programas Efetivos de Triagem de Neonatos

1. Haver disponibilidade de tratamento
2. O início do tratamento bem cedo, antes que os sintomas se manifestem, demonstrou reduzir ou eliminar a gravidade da doença.
3. A observação e o exame físico rotineiro não revelaram o distúrbio no neonato, sendo necessário um teste.
4. Um teste laboratorial rápido e econômico está disponível e é altamente sensível (sem falsos-negativos) e razoavelmente específico (poucos falso-positivos).
5. A condição é freqüente e grave o suficiente para justificar a despesa da triagem. Isto é, a triagem é custo-efetiva.
6. A infra-estrutura social está disponível para informar os genitores da criança e os médicos quanto ao resultado do teste de triagem, confirmar os resultados do teste e instituir o tratamento e a informação genética apropriados.

da infecção. Para muitas condições, mesmo aquelas como a distrofia muscular Duchenne (DMD), para a qual o tratamento é apenas paliativo, o diagnóstico inicial pode permitir uma pronta informação genética antes do nascimento de mais crianças afetadas, ajudando os pais em seu planejamento de diagnóstico pré-natal nas futuras gestações.

Triagem de Adultos

Os conceitos de triagem neonatal foram ampliados para incluir uma proposta de triagem populacional de adultos para hemocromatose, um distúrbio autossômico recessivo relativamente comum no qual a sobrecarga corpórea total de ferro leva, em algumas pessoas, a um dano permanente hepático, pancreático e cardíaco. Cerca de 3 em cada 1.000 pessoas nos EUA têm dois alelos mutantes no gene de hemocromatose, e um alelo mutante em particular, uma substituição de cisteína por tirosina na posição 282, é responsável pela grande maioria dos casos da doença. Muitos homozigotos são assintomáticos, particularmente mulheres, para as quais a penetrância da condição é menor. A triagem pode ser feita pela identificação direta dos alelos mutantes ou por um parâmetro bioquímico, tal como a saturação de transferrina, dependendo de qual teste tenha o melhor custo-benefício. O tratamento por flebotomia repetida para remover as hemácias (ou melhor, o ferro contido na hemoglobina) é altamente efetivo no que diz respeito a evitar o dano aos órgãos, se iniciado antes que os sintomas se desenvolvam. Assim, a triagem populacional pode identificar os homozigotos assintomáticos em risco de desenvolver a doença cedo o suficiente para começar a terapia que pode evitar uma grave morbidade e mortalidade.

Triagem dos Heterozigotos

Em contraste com a triagem da doença genética em neonatos e adultos, a triagem de portadores tem, como seu principal propósito, a identificação de pessoas que, embora sejam saudáveis, correm o risco de ter filhos com uma grave doença autossômica recessiva ou ligada ao X. Os fundamentos da triagem de heterozigotos são destacados no Quadro 20.2.

Os atuais programas de triagem de heterozigotos estão enfocados em determinados grupos étnicos nos quais a freqüência do distúrbio é alta o suficiente para justificar uma triagem (ver Quadro 7.1). A triagem de heterozigotos até agora tem sido usada rotineiramente apenas para a doença de Tay-Sachs (o protótipo da triagem de portadores) e a doença de Canavan, ambas na população de judeus asquenaze, a anemia falciforme, na população afro-americana dos EUA, e a β-talassemia nas áreas de alta incidência, especialmente em Chipre e na Sardenha ou entre emigrantes destas áreas. A triagem de heterozigotos é voluntária e enfoca as pessoas que se identificam como membros de determinado grupo étnico de alto risco.

O impacto da triagem de portadores na diminuição de uma doença genética pode ser enorme. A triagem da doença de Tay-Sachs na população de judeus asquenaze tem sido feita em grande escala desde 1969. A triagem seguida de diagnóstico pré-natal, quando indicada, já diminuiu a incidência da doença de Tay-Sachs de 65% a 85% neste grupo étnico. A prevenção da β-talassemia pela detecção de portadores e diagnóstico pré-natal tem causado uma queda similar na incidência da doença em Chipre e na Sardenha. Em contraste, as tentativas de triagem dos portadores de anemia falciforme na comunidade afro-americana dos EUA têm sido menos efetivas e tiveram pouco impacto sobre a incidência da doença até agora. O sucesso dos programas de triagem para a doença de Tay-Sachs e a β-talassemia, bem como a falha relativa para a anemia falciforme, destaca a importância da consulta à comunidade, da educação e da disponibilidade de informação genética e diagnóstico pré-natal como requisitos cruciais para um programa efetivo.

A possibilidade de detecção direta das mutações comuns de *CFTR* levou a uma séria consideração sobre a possibilidade de triagem populacional de heterozigotos para CF entre as populações caucasianas dos EUA. No momento, os laboratórios de diagnóstico testam a mutação *ΔF508* mais algumas dúzias de alelos mutantes adicionais. O teste destas mutações pode identificar quase 90% de todos os portadores de mutações CF e, portanto, cerca de 80% dos casais em risco (aqueles nos quais ambos os genitores são heterozigotos para uma mutação *CFTR*) na população geral dos EUA. Outros casais em risco, nos quais um membro ou nenhum tem uma mutação identificável, seriam indistinguíveis de outros casais na população (ver Cap. 12).

Na população caucasiana dos EUA, a incidência de CF é de aproximadamente 1 em 2.000, a freqüência do alelo de todas as mutações CF é de 0,0224 e as 30 mutações mais comuns são responsáveis por 90% de todas as mutações. A triagem destas 30 mutações em uma população de 1.000 identificaria 40 e perderia 4 dos 44 portadores esperados. Deve-se destacar que estes cálculos são verdadeiros apenas para os caucasianos dos EUA. Na população de judeus asquenaze, em contraste, a incidência de CF é de 1 em 3.300, e a freqüência de todos os alelos mutantes é, portanto, de $\sqrt{1/3.300} = 0{,}0174$. Como apenas 5 mutações são responsáveis por 97% dos alelos mutantes *CFTR* neste grupo étnico, a triagem destas 5 mutações identificaria 33 dos 34 portadores entre os 1.000 indivíduos triados.

Os testes de heterozigotos de pessoas com uma história familiar de CF e de seus parceiros já são amplamente usados. A perspectiva de triagem populacional para os heterozigotos de CF tem sido amplamente discutida e permanece controversa. Muitos médicos geneticistas acreditam que os testes de heterozigotos devem começar agora. Outros dizem que dados adicionais sobre as diferenças étnicas em freqüências de alelos mutantes devem ser obtidos para desenvolver painéis mais completos de mutações para reduzir a taxa de falso-negativos da triagem de portadores. À medida que se tem mais experiência e são identificadas mutações adicionais, a triagem para os heterozigotos de CF na população em geral provavelmente se tornará uma prática padrão.

QUADRO 20-2

Critérios para os Programas de Triagem dos Heterozigotos

1. Alta freqüência de portadores, pelo menos em uma população específica.
2. Disponibilidade de um teste confiável e barato com taxas bem baixas de falso-negativo e falso-positivo.
3. Acesso às informações genéticas para casais identificados como heterozigotos.
4. Disponibilidade de diagnóstico pré-natal.
5. Aceitação e participação voluntária da população-alvo da triagem.

Triagem Pré-natal

Dois testes são comumente usados para a triagem populacional na vida fetal: a análise cromossômica para idade materna avançada e alfa-fetoproteína do soro materno ou triagens triplas de defeitos do tubo neural e aneuploidias cromossômicas. Este tópico é discutido

no contexto do diagnóstico pré-natal no Cap. 18. Foi dito, entretanto, que, uma vez que a gestação tenha sido exposta ao risco de diagnóstico pré-natal de aneuploidia cromossômica por causa da idade materna avançada, testes adicionais, tais como os níveis de alfafetoproteína no líquido amniótico ou triagem de mutação para CF e outros distúrbios comuns também devem ser oferecidos.

ASPECTOS ÉTICOS DA GENÉTICA MÉDICA

O sucesso da genética médica tem sido acompanhado por um crescimento paralelo no nível de preocupação e ansiedade de que nossos conhecimentos sejam usados criteriosamente para o benefício, e não em detrimento, das pessoas, de suas famílias e da sociedade como um todo. Com o início do Projeto do Genoma Humano nos EUA, o Congresso dos EUA reconheceu os dilemas éticos e o potencial de graves prejuízos para a sociedade pelo mau uso dos conhecimentos muito ampliados da genética humana. O Congresso respondeu determinando que uma parte do orçamento para o Projeto do Genoma Humano americano seja usado para financiar pesquisas e educação sobre as Implicações Éticas Legais e Sociais (ELSI) do projeto. Programas similares também existem em outros países. O esforço ELSI é destinado a estudar o efeito do conhecimento obtido pelo Projeto do Genoma Humano em muitas áreas, incluindo a prática da medicina e de outros profissionais de saúde, a formulação e a administração de políticas públicas, a lei e a educação. Nesta seção, enfocaremos nossa discussão em alguns dos dilemas éticos que surgem na genética médica, dilemas que se tornarão mais difíceis e complexos à medida que o Projeto do Genoma Humano e a pesquisa genética em geral ampliarem nossos conhecimentos genéticos (Quadro 20.3). A lista não está de modo algum esgotada, e os vários aspectos não são independentes uns dos outros.

Em qualquer discussão sobre os aspectos éticos na medicina, três princípios fundamentais são freqüentemente citados: **benefícios** (fazer o bem ao paciente), **respeito pela autonomia individual** (salvaguardar os direitos da pessoa de controlar seus cuidados médicos de modo livre de coação) e **justiça** (garantir que todas as pessoas sejam tratadas igual e justamente). Surgem aspectos éticos complexos quando estes três princípios cardinais são vistos como conflitantes. O papel do trabalho do eticista na interface entre sociedade e a genética médica é avaliar e balancear demandas conflitantes, cada uma das quais sendo considerada como legitimamente baseada em um ou mais destes princípios cardinais.

QUADRO 20-3

Alguns Aspectos Éticos Críticos em Genética Médica

Testes Genéticos
Diagnóstico pré-natal, especialmente para características normais ou sexo
Testes para genes que predispõem à doença de início tardio
Testes do estado de portador em crianças

Privacidade da Informação Genética
Acesso às informações genéticas de uma pessoa

Mau Uso da Informação Genética
Discriminação no trabalho com base no genótipo do empregado
Discriminação ao solicitar um seguro de vida
Discriminação ao solicitar um plano de saúde

Triagem Genética
Estigmatização e privacidade

Dilemas Éticos nos Testes Genéticos

TESTES GENÉTICOS PRÉ-NATAIS

Os geneticistas freqüentemente são solicitados a ajudar casais no uso de diagnósticos pré-natais ou tecnologia de reprodução assistida para evitar ter uma prole com um grave distúrbio hereditário. Deve-se reconhecer que, para alguns distúrbios hereditários, o diagnóstico pré-natal permanece controverso, particularmente quando o diagnóstico leva a uma decisão de abortar a gestação devido a uma doença que, ao contrário da doença de Tay-Sachs, não é uma doença intratável, fatal, da lactância. Existe um debate contínuo na comunidade quanto aos pacientes deficientes, mentalmente retardados e surdos e suas famílias, para citar apenas alguns exemplos, sobre se o diagnóstico pré-natal e o aborto em caso destes distúrbios são justificáveis. O dilema ético é tentar balancear o respeito pela autonomia da tomada de decisão reprodutiva dos genitores com uma avaliação de se abortar um feto afetado por uma incapacidade compatível com a vida é justo ou benéfico para as pessoas incapacitadas.

O dilema é ainda mais agudo quando um casal faz um pedido similar para uma gestação que não corre risco de uma doença ou incapacidade grave. A motivação de procurar o diagnóstico pré-natal deveria incluir evitar a recorrência de um distúrbio associado a um defeito brando ou estético, ou escolha do sexo. A questão da escolha do sexo por motivos que não o de reduzir o risco para doenças limitadas ao sexo ou ligadas ao sexo é muito polêmica. Muitos profissionais de genética estão preocupados com casais que estão usando tecnologias de reprodução assistida, tais como fertilização *in vitro*, biópsia de blastômero ou determinação pré-natal do sexo e aborto, para balancear o sexo dos filhos em sua família ou para evitar ter filhos de um ou outro sexo por motivos sociais e econômicos prevalentes em suas sociedades.

No futuro, alelos e genes específicos que contribuem para características complexas, tais como inteligência, personalidade, estatura e outras características físicas, possivelmente poderão ser identificados durante o curso do Projeto do Genoma Humano. Tais critérios não-médicos serão vistos como uma base justificável para o diagnóstico pré-natal? Alguns poderiam dizer que os genitores já estão, em graus variados, despendendo um tremendo esforço e muitos recursos na melhoria de fatores *ambientais* que contribuem para filhos saudáveis e bem-sucedidos. Eles poderiam, portanto, perguntar por que não melhorar também os fatores *genéticos*? Outros consideram a seleção pré-natal de genes particularmente desejáveis um passo desumanizador, que trata as crianças simplesmente como investimentos ajustados para o benefício dos pais. Novamente o dilema ético está em tentar balancear o respeito pela autonomia da tomada de decisões reprodutivas dos pais com a avaliação de se terminar uma gestação de um feto por um problema estético, ou pelo que é percebido como alelos indesejáveis, ou até mesmo pelo sexo "errado" é justo ou benéfico. Um profissional de saúde tem, por um lado, a responsabilidade e, por outro lado, o direito de decidir por um casal quando um distúrbio não é sério o suficiente para garantir um diagnóstico pré-natal e aborto ou uma reprodução assistida? O debate continua sobre *onde* ou mesmo *se* deve ser traçada uma linha divisória para decidir o que constitui uma característica grave o suficiente para garantir a aplicação da tecnologia dos testes pré-natais.

TESTES GENÉTICOS DE PREDISPOSIÇÃO A UMA DOENÇA

Uma outra área da genética médica na qual os dilemas éticos surgem freqüentemente é a de testes genéticos para doenças que

podem se manifestar mais tarde na vida, depois do período em que estão sendo realizados os testes moleculares. Os princípios éticos de respeito pela autonomia individual e do benefício são centrais aos testes neste contexto. Em uma ponta do espectro está o teste para os distúrbios neurológicos de manifestação tardia, tais como a doença de Huntington (ver Cap. 12). Em tais doenças, as pessoas portadoras do alelo mutante podem ser pré-sintomáticas, mas certamente mais tarde desenvolverão a doença devastadora, para a qual atualmente há pouco ou nenhum tratamento. Para qualquer pessoa pré-sintomática, saber o resultado do teste é mais benéfico que prejudicial ou vice-versa? Como muda o balanço quando o teste indica mutações de predisposição a uma doença, mas que talvez não causem a doença? Por exemplo, no câncer de mama hereditário autossômico dominante (ver Cap. 16), as pessoas portadoras de várias mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* têm de 50% a 90% de chance de desenvolver câncer de mama ou de ovário. A identificação dos portadores heterozigotos pode ser benéfica, pois as pessoas em risco podem optar por uma vigilância mais freqüente ou uma cirurgia preventiva, tal como a mastectomia ou a ooforectomia, ou ambas, embora saibam que estas medidas podem apenas reduzir, mas não eliminar, o aumento de risco de câncer. Ao serem testadas quanto a mutações gênicas de predisposição, estas pessoas correm o risco de graves danos psicológicos, estigmatização em suas vidas sociais e discriminação pela seguradora e no trabalho (ver adiante). E se a vigilância e as medidas preventivas fossem mais efetivas, como o são no câncer hereditário não-polipose do cólon (ver Cap. 16)? O balanço ético muda entre o respeito pela autonomia e o benefício? A decisão ética de ser ou não testado não é uma decisão tomada no vácuo. O paciente deve tomar sua decisão depois de bem informado, usando todas as informações disponíveis quanto ao risco e à gravidade da doença, a efetividade das medidas preventivas e terapêuticas e o prejuízo potencial que pode surgir dos testes.

Testes Genéticos em Crianças

Surgem problemas éticos adicionais quando os testes genéticos envolvem crianças. Como nos adultos, os testes em crianças saudáveis de genes que predispõem a doenças de manifestação tardia podem ser benéficos se houver disponibilidade de intervenções que diminuam a morbidade ou aumentem a longevidade. Testar crianças, entretanto, tem os mesmos riscos de grave dano psicológico, estigmatização e discriminação pelas seguradoras e no trabalho (ver adiante). Além de insistir em que sempre buscamos fazer mais benefícios que danos, um outro princípio ético, o de respeito pela autonomia, deve ser considerado. A autonomia das crianças, sua capacidade de tomar decisões sobre elas mesmas quanto à sua constituição genética, deve ser balanceada com o desejo dos pais de obter tal informação. Existem vários motivos pelos quais os pais podem querer que seus filhos sejam testados. Alguns dizem que mesmo que não existam intervenções médicas claras que possam beneficiar a criança, é dever dos pais informar e preparar seus filhos para a possibilidade futura de desenvolver uma doença grave. Os pais também podem querer esta informação para seu próprio planejamento familiar ou para evitar o que alguns pais consideram como os efeitos corrosivos de esconder deles informações importantes sobre seus filhos.

Um aspecto diferente, mas correlato, surge quando se testa uma criança para o estado de portadora de uma doença que não ameaça sua saúde, mas a coloca em risco de ter filhos afetados. (Novamente o debate é centrado no balanço entre o respeito pela autonomia da criança quanto à sua própria reprodução e o desejo por parte dos pais bem-intencionados de educar e preparar a criança para as decisões difíceis e os riscos que virão quando for adulta.)

A preponderância de opinião entre os bioeticistas é que, a menos que exista um claro benefício para a criança, o teste para uma doença de manifestação tardia ou para a condição de portador só deve ser feito quando o filho tiver idade suficiente, bem como maturidade, tal como ao final da adolescência ou ao atingir a vida adulta, para decidir se deve procurar tal teste.

Dilemas Éticos na Triagem Genética

Embora o objetivo final da triagem genética seja melhorar a saúde pública, também pode haver conseqüências negativas não-intencionais. Como nos testes genéticos, os resultados anormais de triagem podem levar à estigmatização, a conseqüências psicológicas adversas ou à discriminação no local de trabalho ou pelas seguradoras (ver adiante). Entretanto, surgem problemas especiais adicionais dos programas de triagem. Como a triagem genética é feita em um número muito grande de pessoas, há um risco maior do que aquele inerente aos testes genéticos de que a triagem não se ajuste aos altos padrões de consentimento informado ou possa resultar de compulsão, manifesta ou implícita, em fazer o teste. O direito das pessoas de não saber sobre seus genes deletérios pode ficar comprometido se um amplo programa de triagem estiver sendo feito. A questão da privacidade do acesso não-autorizado à coleta de dados ou mesmo às próprias amostras é uma preocupação ainda maior, pois as pessoas que estão sendo triadas geralmente não procuraram o teste em função de uma pessoa afetada na família. Por exemplo, quem terá acesso aos dados e à amostra, e como podemos ter certeza de que amostras, tal como de DNA, não serão usadas para outros fins que não os testes de triagem para os quais foram coletadas e para os quais foi dada permissão? É claro que estes aspectos devem ser considerados no planejamento dos programas de triagem, os quais requerem uma revisão ética para garantir que as preocupações estão sendo consideradas e as medidas de segurança foram tomadas.

Privacidade da Informação Genética e Seu Mau Uso

Um terceiro princípio ético importante, juntamente com o benefício e o respeito à autonomia, é a justiça — a exigência de que todos sejam capazes de se beneficiar igualmente dos progressos na genética médica. A justiça é uma preocupação importante na área do uso da informação genética no emprego e na seguradora. É justo estigmatizar uma pessoa que, sem sua culpa, possui uma predisposição para uma doença?

Quanto ao emprego, os empregadores deveriam obter informações genéticas ao tomar a decisão de contratar se esta informação os ajuda a escolher empregados saudáveis e confiáveis com isenção? Em particular, alguns dizem que o empregador que financia um plano de saúde para o empregado deve ter acesso a tal informação ao tomar a decisão de contratar, de modo que possa recusar pessoas em risco de desenvolver uma doença grave mais tarde que possa prejudicar muito o plano de saúde do empregado.

Na área de seguros de vida, as seguradoras insistem em que devem ter acesso a todas as informações genéticas de que seus clientes disponham. As empresas de seguro de vida calculam seus prêmios com base em dados atuariais de sobrevida por idade específica sobre a média da população. Os prêmios não cobrem perdas se o cliente souber que tem um alto risco de desenvolver uma doença, esconder esta informação e comprar um seguro de vida extra.

A questão da disponibilidade de plano de saúde para pessoas portadoras de alelos de genes que predispõem à doença é outro problema nas sociedades que não têm uma cobertura geral de saúde, como nos EUA. Os planos de saúde rotineiramente colhem a história familiar, um histórico de fumo e pedem a pressão sanguínea, o nível de colesterol sérico ou um teste de urina ao decidir a disponibilidade e os prêmios de seguro de saúde. As seguradoras perguntam por que não podem fazer testes que detectem genes que aumentam o risco de doença. A constituição genética de uma pessoa é diferente dos dados fenotípicos e históricos? Muitos dizem que *há* uma clara distinção entre o que são as manifestações fenotípicas de uma doença, tal como a hipertensão, a hipercolesterolemia e a diabetes melito, e os alelos de predisposição, tais como as mutações *BRCA1* (ver Cap. 16) e os alelos *APOE* $\varepsilon 4$ (ver Cap. 15), que podem jamais resultar em uma doença manifesta nas pessoas que os possuem.

Como se pode ver por estes exemplos, a genética médica terá um profundo impacto além dos estreitos limites da prática médica, e a integração deste conhecimento a uma sólida política pública irá requerer os esforços coordenados do governo, dos empregadores e do público.

EFEITOS EUGÊNICOS E DISGÊNICOS NAS FREQÜÊNCIAS GÊNICAS

O Problema da Eugenia

O termo **eugenia**, introduzido pelo primo de Darwin, Francis Galton, em 1883, refere-se à melhoria de uma população pela seleção apenas dos "melhores" para a reprodução. Os criadores de plantas e animais seguiram esta prática desde épocas antigas. No final do século XIX, Galton e outros começaram a promover a idéia de usar cruzamentos seletivos para melhorar a espécie humana, iniciando, assim, o chamado movimento eugenista, que foi amplamente defendido pela metade do século seguinte. As chamadas qualidades ideais que o movimento da eugenia procurava para promover o encorajamento de alguns tipos de reproduções humanas freqüentemente eram definidos por preconceitos sociais, étnicos e econômicos e alimentaram os sentimentos antiimigração e racial na sociedade. Por exemplo, foram cometidos enormes excessos nos EUA durante a primeira metade do século XX, quando foi feita a esterilização involuntária baseada em leis que apoiavam a eugenia. O que hoje consideramos uma falta de instrução foi descrito na época como "debilidade mental" familiar. O que hoje chamamos de pobreza rural foi considerado pelos eugenicistas como uma "incapacidade" hereditária. Embora muitos cientistas tenham começado a apreciar as dificuldades teóricas e práticas dos programas de eugenia, ela só se tornou totalmente desacreditada quando foi usada na Alemanha nazista como justificativa para o extermínio em massa.

Existem duas grandes dificuldades no planejamento de um programa de eugenia: (1) o problema científico de determinar que características são verdadeiramente herdáveis e até que ponto a hereditariedade contribui para uma característica, e (2) as questões éticas insolúveis envolvidas na determinação de quem decidirá quando uma característica é mais desejável que a outra e como o comportamento reprodutivo pode ser influenciado no desenvolvimento de um programa eugênico. Como descrito no Cap. 15, a grande maioria das características humanas, mesmo aquelas com algum componente genético, é de herança complexa e fortemente influenciada por fatores ambientais. Um enfoque puramente genético para modificar a incidência de tais doenças que ignore os fatores ambientais será muito restritivo. Também é muito provável que, como ilustrado pelas condições autossômicas recessivas, a simples restrição da reprodução de pessoas com fenótipos indesejáveis, que são de herança complexa, possa ter pouco ou nenhum efeito demonstrável na freqüência dos alelos contribuintes ou, mais importante, no fenótipo indesejável. Igualmente importante, não está claro como podemos balancear a autonomia e os direitos de privacidade individual com as legítimas preocupações de saúde pública sem subordinar a pessoa a metas sociais teóricas de "melhoria do conjunto gênico". Este último conceito é uma meta totalitária não muito distante da doutrina nazista de higiene racial.

O Problema da Disgenia

O oposto da eugenia é a **disgenia**, uma deterioração da saúde e do bem-estar de uma população por meio de práticas que permitam o acúmulo de alelos deletérios. No caso de alguns defeitos monogênicos, o tratamento médico pode ter um efeito disgênico pela redução da seleção contra um genótipo em particular, permitindo, assim, que a incidência de genes prejudiciais aumente. O efeito de uma seleção relaxada é mais marcante para distúrbios autossômicos dominantes e ligados ao X que para distúrbios autossômicos recessivos, nos quais a grande maioria dos alelos mutantes está nos heterozigotos portadores silenciosos. Por exemplo, se todas as pessoas afetadas pela CF pudessem sobreviver e se reproduzir a uma taxa normal, a incidência da doença subiria de 1 em 2.000 para apenas 1 em 1.550 em 200 anos. Em contraste, caso se conseguisse um tratamento bem-sucedido para a DMD, a terapia para DMD poderia fazer com que a incidência da doença subisse muito, pois os genes *DMD* dos homens afetados seriam transmitidos para todas as suas filhas. O efeito desta transmissão aumentaria muito a proporção de portadoras na população.

Os distúrbios genéticos comuns com herança complexa, discutidos no Cap. 15, também poderiam se tornar mais comuns se a seleção fosse removida. As malformações cardíacas congênitas e a fenda labial e palatina são características multifatoriais que limitaram a adaptabilidade reprodutiva no passado, mas hoje em geral são tratadas com sucesso pela cirurgia. Similarmente, a descoberta da insulina, um grande avanço médico, poderia levar a um aumento na incidência da diabetes melito tipo 1, por permitir que um jovem diabético sobreviva e se reproduza. Uma situação similar pode ocorrer com os defeitos do tubo neural, nos quais a suplementação com ácido fólico durante a gestação pode ter um impacto rápido e significativo em reduzir a incidência do distúrbio. Como os distúrbios complexos comuns são causados por fatores genéticos, a incidência destes distúrbios pode aumentar um pouco, embora seja provável que, como nas doenças autossômicas recessivas, a maioria dos alelos de suscetibilidade esteja distribuída entre as pessoas não-afetadas. Conseqüentemente, a reprodução das pessoas afetadas teria pouco efeito na freqüência dos alelos.

Por outro lado, a consulta genética e as decisões parentais em limitar a reprodução podem reduzir muito a incidência de algumas doenças, particularmente aquelas com padrão ligado ao X ou autossômico dominante. Se ninguém com risco de doença de Huntington em sua prole se reproduzisse, por exemplo, haveria um grande efeito na incidência do gene responsável. Outras doenças autossômicas dominantes de manifestação tardia, tais como a distrofia miotônica, também se tornariam menos comuns se os membros familiares em risco fossem identificados e optassem por não se reproduzir ou escolhecem fazer um diagnóstico pré-natal e então assegurar que o gene da doença não fosse transmitido. No caso das condições autossômicas recessivas, entretanto, o efeito na freqüência do alelo mutante pelo aborto de todas as gestações dos

homozigotos afetados seria pequeno, pois a maioria destes alelos é levada silenciosamente pelos heterozigotos.

O impacto a longo prazo das atividades da genética médica que podem afetar as freqüências gênicas pode ser difícil de prever. À medida que o diagnóstico pré-natal (ver Cap. 18) se tornar mais generalizado, várias gestações nas quais o feto tem um defeito genético serão interrompidas, com o resultado potencial de reduzir a freqüência dos distúrbios. No momento, entretanto, ninguém avaliou com que amplitude a interrupção das gestações por motivos genéticos é seguida de **compensação reprodutiva**, isto é, o nascimento de crianças adicionais não-afetadas, muitas das quais são portadoras do gene deletério. Algumas famílias com distúrbios ligados ao X optam por interromper as gestações nas quais o feto é masculino, mas, logicamente, as filhas de tais famílias, embora não-afetadas, podem ser portadoras. Assim, a compensação reprodutiva tem a conseqüência potencial a longo prazo de aumentar a freqüência do distúrbio genético que levou à perda de um filho afetado.

A triagem populacional de portadores de distúrbios autossômicos recessivos pode alterar a incidência da doença, fazendo com que os casais em risco de ter filhos afetados procurem uma informação genética. Os programas de triagem de heterozigotos também terão algum impacto nos distúrbios dominantes e ligados ao X, mas os distúrbios mais graves nestas duas classes de doenças herdáveis ainda continuariam a recorrer, devido a novas mutações.

CONCLUSÃO

A última metade do século XX será lembrada como a era na qual o estudo da genética humana e médica foi revolucionado pela biologia molecular, particularmente a tecnologia do DNA recombinante, o que levou a uma explosão dos nossos conhecimentos sobre a base molecular da hereditariedade humana. Os genes deixaram de ser unidades teóricas portadoras da informação, cuja existência tinha que ser deduzida pelo estudo dos padrões de transmissão de várias características, e se tornaram objetos materiais, segmentos de DNA, nos quais a informação está codificada por regras que puderam ser descobertas e compreendidas. A expressão final da revolução da genética humana é o Projeto do Genoma Humano. No começo do século XXI, a espécie humana tem, pela primeira vez, uma seqüência representativa completa de seu DNA, um inventário de seus genes, um esforço vigoroso e contínuo no sentido de identificar e caracterizar a variação no nível de seqüência do DNA e uma base de conhecimentos em rápida expansão, na qual várias características e predisposições à doença serão atribuíveis à variação de seqüência do DNA. A genética humana já começou a ter um impacto importante em muitas áreas da medicina. O conhecimento obtido pelo Projeto do Genoma Humano revolucionará a medicina clínica tão profundamente quanto a demonstração anterior de que as leis da química eram as mesmas, ocorresse a reação em tubo de ensaio ou nas células do corpo. O desafio que temos é assegurar que os avanços do conhecimento da genética humana e da tecnologia sejam usados com responsabilidade, justiça, e humanidade. Afinal, a **Genética Médica** não trata apenas do conhecimento, mas sim da melhoria da saúde, do alívio do sofrimento e do aumento da dignidade humana.

Referências Gerais

Andrews LB, Fullarton JE, Holtzman NA, Motulsky AG (1994) Assessing Genetic Risks: Implications for Health and Social Policy National Academy Press, Washington, DC

Beauchamp TL, Childress JF (1994) Principles of Biomedical Ethics, 4th ed. Oxford University Press, New York.

Chadwick RF (1999) The Ethics of Genetic Screening *In* The Library of Medical Ethics and Theoretical Medicine, Vol 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Harper PS (1997) Genetic testing, life insurance, and adverse selection. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 352:1063–1066.

Hudson KL, Rothenberg KH, Andrews LB, et al (1995) Genetic discrimination and health insurance: An urgent need for reform. Science 270:391–393

Kevles D (1995) In the Name of Eugenics: Genetics and the Uses of Human Heredity Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts

Lapham EV, Kozma C, Weiss JO (1996) Genetic discrimination: Perspectives of consumers. Science 274:621–624.

Mahowald MB, Verp MS, Anderson RR (1998) Genetic counseling: Clinical and ethical challenges. Annu Rev Genet 32:547–549.

Murray TH (1991) Ethical issues in human genome research. FASEB J 5:55–60.

Pokorski RJ (1997) Insurance underwriting in the genetic era Am J Hum Genet 60:205–216

Web sites of the American Society of Human Genetics, the American College of Medical Genetics, the American Board of Genetic Counseling, and the National Human Genome Research Institute all carry policy statements on various aspects of medical genetics:
http://www.faseb.org/genetics/ashg/ashgmenu.htm
http://www.faseb.org/genetics/acmg/acmgmenu.htm
http://www.faseb.org/genetics/abgc/abgcmenu.htm
http://www.nhgri.nih.gov/ELSI/

Problemas

1. Um casal com dois filhos é encaminhado para informação genética porque seu filho mais novo, um menino de 8 anos, tem um distúrbio de movimento para o qual está sendo considerado o teste de doença de Huntington juvenil. Quais são as considerações éticas para a família quanto ao teste?

2. Pesquise a literatura e investigue a história dos programas de triagem neonatal da anemia falciforme nos EUA. Que benefícios potenciais podem surgir de tais testes? Que prejuízos? Considere o contexto histórico no qual a triagem foi feita e a extensão na qual a comunidade afro-americana foi envolvida no planejamento e na implementação do teste.

3. Um projeto de pesquisa triou mais de 40.000 nascimentos não-selecionados consecutivos quanto ao número de cromossomos X e à presença de um cromossomo Y e correlacionou o cariótipo quanto aos cromossomos sexuais com o sexo atribuído pela inspeção visual no berçário. A finalidade do projeto era acompanhar as crianças com anomalias de cromossomos sexuais (ver o Cap. 10) prospectivamente quanto às dificuldades de desenvolvimento. Quais as considerações éticas em efetuar este projeto?

4. Um departamento de saúde estadual propôs fazer um teste de triagem quanto à surdez profunda em neonatos. Discuta a propriedade de tal programa de triagem, aplicando os critérios comumente usados para decidir fazer ou não um determinado teste de triagem de neonatos

Glossário

Acentuador Uma seqüência de DNA que atua em *cis* (no mesmo cromossomo) para aumentar a transcrição de um gene vizinho O acentuador pode estar "antes" ou "depois" do gene e pode estar na mesma orientação ou em orientação reversa. Contrasta com *silenciador*

Ácido desoxirribonucleico Ver *DNA*

Ácido ribonucleico Ver *RNA*

Acoplamento Quando duas mutações não-alélicas são levadas no mesmo cromossomo, diz-se que as duas mutações estão em acoplamento. Se estiverem em membros opostos de um par de cromossomos homólogos, elas estarão em *repulsão*

Acrocêntrico Um tipo de cromossomo com o centrômero perto de uma ponta. Os cromossomos acrocêntricos humanos (13, 14, 15, 21 e 22) têm satélites nos braços curtos que possuem genes para RNA ribossômico

Adaptabilidade (f) A probabilidade de alguém transmitir genes para a geração seguinte, comparada com a probabilidade média de uma população

Alças Arranjo da cromatina, arrumada como solenóides, ligada ao arcabouço do cromossomo. Tida como uma unidade estrutural, funcional ou ambas dos cromossomos

Alelo Uma versão alternativa de um gene que pode ocupar um determinado locus

Alelo nulo Um alelo que resulta ou na total ausência do produto gênico ou na total perda de função no nível fenotípico

Alelo pseudodeficiente Um alelo clínico benigno que tem uma redução na atividade funcional detectada por dosagens *in vitro*, mas que tem atividade suficiente *in vivo* para evitar a haploinsuficiência

Alelo silenciador Um gene mutante que não tem efeito fenotípico detectável

Alfa-fetoproteína (AFP) Uma glicoproteína fetal presente no líquido amniótico, que atinge concentração anormalmente alta neste líquido (e no soro materno) quando o feto tem algumas anomalias, especialmente um defeito de tubo neural aberto

Alogênico Nos transplantes, indica indivíduos (ou tecidos) que são da mesma espécie, mas têm antígenos diferentes

Amniocentese Um procedimento usado no diagnóstico pré-natal para obter líquido amniótico, o qual contém células de origem fetal que podem ser cultivadas para análise O líquido amniótico é retirado por uma seringa com uma agulha inserida na bolsa amniótica através da parede abdominal e da parede uterina

Amplificação Em biologia molecular, a produção de múltiplas cópias de uma seqüência de DNA Também, em citogenética, refere-se a múltiplas cópias de uma seqüência no genoma que são detectáveis por hibridização genômica comparativa (CGH)

Análise bayesiana Um método matemático amplamente usado na consulta genética para calcular os riscos de recorrência. O método combina a informação de várias fontes (genética, informações de heredogramas e resultados de testes) para determinar a probabilidade de que uma determinada pessoa possa desenvolver ou transmitir uma certa doença

Análise de ligação Um método estatístico no qual os genótipos e fenótipos dos genitores e da prole nas famílias são estudados para se determinar se dois ou mais loci estão sendo distribuídos independentemente ou estão apresentando ligação durante a meiose

Análise de ligação baseada em modelo A análise de ligação que é baseada em supor um determinado modo de herança para deduzir quando ocorreram os crossings entre dois loci. Também chamada de *análise de ligação paramétrica.*

Análise de ligação livre de modelo Análise de ligação que não faz suposição quanto ao modo de herança. Esta forma de análise é baseada na determinação de se a extensão de alelos compartilhados em qualquer loci entre indivíduos aparentados que compartilham ou não uma doença ou característica se desvia significativamente da que seria esperada apenas por acaso. Ver *método do membro afetado no heredograma* Também chamada de *análise de ligação não-paramétrica*

Análise de par de irmãos Uma forma de análise de ligação livre de modelo na qual pares de irmãos, concordantes ou discordantes para um fenótipo ou característica, são analisados em loci no genoma para determinar se há alguns loci nos quais eles compartilham alelos mais ou menos significativamente que a média esperada de 50%

Análise de segregação Um método estatístico que avalia os fenótipos dos indivíduos nas famílias para determinar o modo mais provável de herança de uma doença ou característica

Análise multiponto de ligação Localização da ordem de três ou mais loci pelo exame dos genótipos da prole de genitores heterozigotos em dois loci e pela determinação de uma ordem que diminuiria o número de recombinações duplas muito improváveis em um intervalo curto

Aneuploidia Qualquer número cromossômico que não seja um múltiplo exato do número haplóide ou uma pessoa com um número cromossômico aneuplóide. As formas comuns de aneuploidia em humanos são a *trissomia* (a presença de um cromossomo extra) ou a *monossomia* (a ausência de um único cromossomo)

Aneussomia segmentar A perda de um pequeno segmento de um cromossomo de um par, resultando em hemizigose para genes neste segmento no cromossomo homólogo. Ver também *síndrome de genes contíguos*

Antecipação O início progressivamente mais precoce e com aumento de gravidade de algumas doenças em gerações sucessivas de uma família Causada pela expansão do número de repetições de trincas dentro ou associadas ao gene responsável pela doença

Anticódon Uma unidade de três bases de RNA complementar ao códon no mRNA

Apoptose A morte celular programada, caracterizada por um padrão estereotipado de disfunção mitocondrial e degradação de cromatina

Arcabouço A estrutura não-histônica observada quando as histonas são experimentalmente removidas dos cromossomos. Tido como representando um componente estrutural do núcleo e dos cromossomos

Associação Em genética humana, descreve a situação na qual um determinado alelo é encontrado com uma freqüência significativamente

maior ou menor em um grupo de indivíduos afetados do que se poderia esperar pela freqüência do alelo na população geral da qual foram obtidas as pessoas afetadas. Não confundir com *ligação*.

Ativação de célula B O processo que resulta na produção de anticorpos secretados por plasmócitos, iniciado pela interação gene-anticorpo na membrana da célula B, seguido da expansão clonal e diferenciação de células B.

Autólogo Refere-se a enxertos no mesmo animal de uma parte para outra ou a células malignas e as células do indivíduo no qual elas surgiram.

Autonomia Uma situação durante o desenvolvimento embrionário em que o destino de uma célula é independente dos genes expressos por suas células vizinhas.

Autossomo Qualquer cromossomo nuclear que não seja os cromossomos sexuais; 22 pares no cariótipo humano. Uma doença causada pela mutação em um gene autossômico ou par de genes apresenta *herança autossômica*.

Averiguação O método de seleção de indivíduos para inclusão em um estudo genético.

Bacteriófago lambda Um vírus que infecta bactérias; usado em biologia molecular como vetor para clonagem de seqüências de DNA de até 20 kb de tamanho.

Bandeamento Uma das várias técnicas que coram cromossomos em um padrão característico, permitindo a identificação de cromossomos individuais e anomalias estruturais. Ver *Bandas C, Bandas G, Bandas Q, Bandas R,* no texto.

Biblioteca Em biologia molecular, uma coleção de clones recombinantes que contêm uma amostra aleatória do DNA ou RNA (como o cDNA) de um tecido.

Bioinformática Análise computacional e armazenamento de dados biológicos e experimentais, amplamente aplicada aos estudos genômicos e proteômicos.

Bivalente Um par de cromossomos homólogos em associação, como visto na metáfase da primeira divisão meiótica.

Camundongo inativado (*knockout*) Camundongo no qual um gene específico foi perturbado ou "marcado" pela tecnologia do DNA recombinante. Usados como modelos para investigação da função e das interações das contrapartes normais dos genes perturbados.

Camundongos transgênicos Camundongos que levam um gene exógeno ("transgene") em seu genoma, produzido pela injeção em ovócitos de um DNA exógeno. Se o transgene se incorporou à linhagem germinativa, ele também pode ser transmitido para a prole.

Cap Um nucleotídeo modificado adicionado à ponta 5′ de uma cadeia crescente de mRNA, necessário para o processamento normal, a estabilidade e a tradução do mRNA.

Característica benigna Uma característica variante sem significado clínico.

Característica qualitativa Uma característica na qual um indivíduo ou tem a característica ou não tem. Contrasta com *característica quantitativa*.

Característica quantitativa Uma característica que é mensurável quantitativamente e que difere entre vários indivíduos, em geral seguindo uma distribuição normal na população. Contrasta com *característica qualitativa*.

Carga genética A soma total de mortes e defeitos causados por genes mutantes.

Cariotipagem espectral (SKY) Um procedimento que usa a técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) para corar distintamente cada um dos 24 cromossomos humanos.

Cariótipo A constituição cromossômica de um indivíduo. O termo também é usado para uma fotomicrografia dos cromossomos de uma pessoa sistematicamente arrumados e para o processo de preparação de tal fotomicrografia.

Casamento preferencial Seleção de um cônjuge com preferência para um determinado genótipo, ou seja, uma reprodução não-aleatória. Em geral a preferência é positiva (preferência por um parceiro com o mesmo genótipo) e com menos freqüência é negativa (preferência por um cônjuge de genótipo diferente).

Caso índice Um membro afetado de uma família que é o primeiro a chamar a atenção para um heredograma de um distúrbio genético. Ver *probando*.

Caso isolado Um indivíduo que é o único membro de sua família afetado por um distúrbio genético, seja por acaso ou por uma nova mutação. Ver também *esporádica*.

cDNA Ver *DNA complementar*.

Célula híbrida Uma célula formada pela fusão de duas células de origem diferente na qual os dois núcleos se fundiram em um. Pode ser clonada para produzir linhagens celulares híbridas.

Célula-tronco Um tipo de célula capaz de se auto-renovar, proliferar e se diferenciar.

Célula-tronco embrionária Uma célula derivada da massa celular interna que se auto-renova em cultura e, quando reintroduzida na massa celular interna de um blastocisto, pode repopular todos os tecidos do embrião.

CentiMorgan (cM) A unidade de distância entre os genes ao longo dos cromossomos, assim denominada em homenagem a Thomas Hunt Morgan. Dois loci distam 1 cM se a recombinação for detectada entre eles em 1% das meioses.

Centrômero A constrição primária no cromossomo, uma região na qual as cromátides irmãs são mantidas juntas e onde se forma o cinetócoro. Necessário para a segregação normal na mitose e meiose.

Centrossomos Um par de centros que organizam o crescimento de microtúbulos do fuso mitótico; vistos nos polos da célula em divisão no final da prófase.

Chance Uma proporção de probabilidades ou riscos. Em geral calculada como uma proporção da probabilidade de um evento ocorrer *versus* a probabilidade dele não ocorrer, como um modo de avaliar a chance relativa do evento. A chance pode variar de 0 ao infinito.

Ciclo celular Os estágios entre duas divisões mitóticas sucessivas, descritos no texto. Consistem em G_1, S, G_2 e M.

Cinetócoro Uma estrutura no centrômero à qual se prendem as fibras do fuso.

Citotrofoblasto As células fetais das vilosidades coriônicas que são colhidas para cariotipagem e análise de DNA.

Clonagem molecular Transferência de uma seqüência de DNA para uma única célula de um microrganismo, seguida de uma cultura de microrganismos para produzir grandes quantidades da amostra de DNA para análise.

Clonagem posicional A clonagem molecular de um gene com base no conhecimento de sua posição de mapa, sem conhecimento prévio do produto gênico.

Clone (1) Uma linhagem celular derivada por mitose de uma única célula diplóide ancestral. Em embriologia, a linhagem celular na qual as células ficaram geograficamente próximas umas das outras. (2) Em biologia molecular, uma molécula de DNA recombinante contendo um gene ou outra seqüência de DNA de interesse. Também, o ato de gerar tal linhagem celular ou clone.

Código genético As 64 trincas de bases que especificam os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas (ver Quadro 3.1).

Co-dominante Se ambos os alelos de um par forem expressos no estado heterozigoto, então os alelos (ou as características determinadas por eles, ou ambos) serão co-dominantes.

Códon Uma trinca de bases em uma molécula de DNA ou RNA, especificando um só aminoácido.

Códon de término Um dos três códons (UAG, UAA e UGA) que terminam a síntese de um polipeptídeo. Também chamado de *códon finalizador* (ver Quadro 3.1).

Códon finalizador Ver *códon de término*.

Coeficiente de correlação (r) Uma medida da correlação que varia de 1 para uma perfeita correlação positiva, — 1 para uma perfeita correlação negativa e 0 quando não há correlação entre pares de medidas.

Coeficiente de endogamia (F) A probabilidade de que uma pessoa homozigota em um locus receba ambos os alelos de um ancestral (os alelos são *idênticos por descendência*).

Colinearidade A correlação entre a seqüência de bases do DNA de um gene (ou do RNA transcrito dele) e a seqüência de aminoácidos do polipeptídeo correspondente.

Compensação de dose Como conseqüência da inativação do X, a quantidade de produto formado pelas duas cópias de um gene ligado ao X nas mulheres é equivalente à quantidade formada pelo único gene dos homens. Ver *inativação do X*.

Complementação Em genética, a habilidade das células dos pacientes com dois defeitos genéticos diferentes em corrigir uma à outra, demonstrando assim que os defeitos não são idênticos A complementação pode ser intergênica ou intragênica.

Complementação intergênica A habilidade das células de pacientes com fenótipos similares, devido a mutações em genes diferentes, de corrigir uma à outra

Complementação intragênica (ou interalélica) A habilidade de um alelo mutante em um locus de corrigir a perda de função associada a outro alelo neste locus, demonstrando assim que as mutações não são idênticas (ver *complementação*).

Complementariedade A natureza complementar do pareamento de bases no DNA.

Complexo principal de histocompatibilidade (MHC) O locus complexo no cromossomo 6p que inclui os genes altamente polimórficos de antígeno leucocitário humano (HLA).

Composto (heterozigoto composto) Um indivíduo, ou um genótipo, com dois alelos mutantes diferentes no mesmo locus. Não confundir com *homozigoto*, no qual os dois alelos mutantes são idênticos.

Comprometimento A transição de uma célula embrionária da pluripotência para seu destino particular.

Concordância Descreve um par de parentes nos quais (1) ambos os membros do par têm uma determinada característica qualitativa ou (2) ambos os membros têm valores de uma característica quantitativa que são de magnitude similar. Ver *discordância*

Congênito Presente ao nascimento, mas não necessariamente genético.

Consangüíneos Relacionados por descendência de um ancestral comum.

Constrição primária Ver *centrômero*.

Consulente Na consulta genética, a pessoa que procura o consultor genético para uma informação genética.

Consulta genética O fornecimento de informações e assistência a pessoas afetadas ou membros familiares com risco de um distúrbio que pode ser genético, com relação às conseqüências do distúrbio, à probabilidade de desenvolver ou transmiti-lo e aos modos pelos quais ele pode ser atenuado ou evitado

Contig Um conjunto de grandes fragmentos superpostos de DNA, em geral um DNA humano clonado, que inclui um segmento de DNA contendo um gene de interesse e marcadores genéticos vizinhos. Usado no mapeamento físico de alta resolução.

Cordocentese Um procedimento usado no diagnóstico pré-natal para obter uma amostra de sangue fetal diretamente da placenta.

Corpúsculo de Barr A cromatina sexual como é vista nas células somáticas femininas, representando um cromossomo X inativo.

Correlação Um instrumento estatístico aplicado a um conjunto de medidas pareadas. Existe uma correlação positiva quando quanto maior for a primeira medida no par, maior será a segunda medida no par. Uma correlação negativa é o oposto, isto é, quanto maior a primeira medida, menor a segunda.

Cromátides Os dois filamentos paralelos de cromatina, conectados pelo centrômero, que constituem um cromossomo após a síntese do DNA.

Cromatina A associação de DNA e proteínas da qual são compostos os cromossomos. Ver também *nucleossomo*.

Cromatina sexual Ver *corpúsculo de Barr*

Cromossomo Uma das estruturas filamentares do núcleo da célula. Consiste em cromatina e porta a informação genética (DNA)

Cromossomo artificial de levedura (YAC) O vetor de clonagem composto de telômeros e centrômeros do cromossomo de levedura, ao qual podem ser ligados grandes (mais de 1.000 kb de tamanho) fragmentos de DNA.

Cromossomo em anel Um cromossomo estruturalmente anormal, no qual o telômero de cada braço cromossômico foi deletado e os braços quebrados foram reunidos em forma de anel

Cromossomo Philadelphia (Ph[1]) O cromossomo 22 estruturalmente anormal que ocorre tipicamente em uma proporção das células da medula óssea na maioria dos pacientes com leucemia mielóide crônica. A anomalia é uma translocação recíproca entre a parte distal de 22q e a parte distal de 9q

Cromossomo recombinante Um cromossomo que resulta da troca de segmentos recíprocos por crossing entre um par homólogo de cromossomos parentais durante a meiose

Cromossomos artificiais de bactérias (BACs) Vetores capazes de levar de 100 a 300 kb de DNA humano clonado; propagados em bactérias e usados no mapeamento gênico de alta resolução e seqüenciamento de DNA.

Cromossomos filhos Os dois cromossomos individuais formados quando um único cromossomo composto de cromátides pareadas se separa pelo centrômero na anáfase da divisão celular.

Cromossomos homólogos (homólogos) Um par de cromossomos, um herdado paternamente, o outro herdado maternamente, que formam par durante a meiose I, sofrem crossing over e separam-se na anáfase I da meiose. Os cromossomos homólogos em geral têm tamanhos e formas similares quando vistos ao microscópio e contêm os mesmos loci, exceto pelos dois cromossomos sexuais nos homens (X e Y), que são apenas parcialmente homólogos (ver *região pseudo-autossômica*)

Cromossomos sexuais Os cromossomos X e Y

Crossing, crossing over A troca recíproca de segmentos entre cromátides de cromossomos homólogos, uma característica da prófase da primeira divisão meiótica. Ver também *recombinação*. O *crossing over desigual* entre cromátides mal-alinhadas pode levar à duplicação do segmento envolvido em uma cromátide e à deleção no outro e é causa freqüente de mutação.

Defeito de nascimento Uma anomalia presente ao nascimento, não necessariamente genética.

Degeneração (redundância) do código O código genético é descrito como degenerado (redundante) porque a maioria dos 20 aminoácidos é especificada por mais de 1 dos 64 códons.

Deleção A perda de uma seqüência de DNA de um cromossomo. O DNA deletado pode ser de qualquer tamanho, desde uma só base até uma grande parte do cromossomo.

Deleção *in frame* Uma deleção que não destrói a matriz de leitura normal do gene.

Deriva genética Flutuação aleatória de freqüências gênicas em populações pequenas

Desenvolvimento em mosaico Desenvolvimento embriológico no qual regiões diferentes do embrião se desenvolvem independentemente das regiões vizinhas. Ver *desenvolvimento regulador*.

Desenvolvimento regulador Um estágio do desenvolvimento durante o qual a remoção ou a destruição de uma determinada região do embrião é compensada por outras regiões embrionárias, permitindo, assim, o desenvolvimento normal.

Desequilíbrio de ligação A ocorrência de combinações específicas de alelos na fase de acoplamento em dois ou mais loci ligados com mais freqüência que se poderia esperar pelo acaso.

Desnaturação (do DNA) A conversão do DNA de bifilamentar em um estado unifilamentar, geralmente feita por aquecimento para destruir as ligações químicas envolvidas no pareamento de bases.

Destino A estrutura ou o tecido no qual uma determinada região de um embrião se desenvolve normal e regularmente. O *mapa de destino* embrionário é uma descrição completa de todos os destinos de todas as diferentes partes do embrião.

Determinação Durante o desenvolvimento, o segundo estágio de comprometimento, no qual uma célula segue seu programa desenvolvimental independente de ter sido transplantada para uma região diferente do embrião.

Diagnóstico pré-implantação Um tipo de diagnóstico pré-natal no qual a célula é removida de um embrião multicelular gerado por fertilização *in vitro* e testado quanto à presença de uma mutação causadora de doença.

Dicêntrico Um cromossomo estruturalmente anormal, com dois centrômeros.

Dictióteno O estágio da primeira divisão meiótica no qual um ovócito humano permanece desde o final da vida fetal até a ovulação.

Diferenciação O processo pelo qual uma célula adquire um padrão histoespecífico de expressão de genes e proteínas e um fenótipo característico.

Diminutos duplos Cromossomos acessórios muito pequenos. Uma forma de amplificação gênica.

Diplóide O número de cromossomos da maioria das células somáticas, que é o dobro do número encontrado nos gametas. Nos humanos, o número diplóide de cromossomos é 46.

Discordância A situação na qual (1) um membro do par tem uma certa característica qualitativa e o outro não ou (2) os parentes têm valores de uma característica quantitativa que estão em extremidades opostas da distribuição. Ver *concordância*.

Dismorfismo Anomalias do desenvolvimento morfológico, como vistas em muitas síndromes de origem genética ou ambiental.

Dispersão cromossômica Os cromossomos de uma célula em divisão vistos ao microscópio na metáfase ou pró-metáfase.

Disrupção Um defeito de nascimento causado pela destruição de um tecido. Pode ser causado por oclusão vascular, um teratógeno ou uma ruptura do saco amniótico.

Dissomia Ver *dissomia uniparental*.

Dissomia uniparental A presença no cariótipo de duas cópias de um cromossomo específico, ambas herdadas de um genitor, sem representante deste cromossomo do outro genitor. Se ambos os homólogos do par parental estiverem presentes, a situação é de *heterodissomia*; se um homólogo parental estiver presente em duplicata, a situação é de *isodissomia*. Ver *síndrome de Prader-Willi, síndrome de Angelman*, no texto.

Distribuição A distribuição aleatória de combinações diferentes de cromossomos parentais para os gametas. Os genes não-alelos são distribuídos independentemente, a menos que estejam ligados.

Distúrbio auto-imune Uma doença caracterizada por uma resposta imune anormal, aparentemente dirigida contra antígenos dos próprios tecidos da pessoa. Tida como estando relacionada à variação na resposta imune resultante de polimorfismo nos genes de resposta imune.

Distúrbio cromossômico Uma condição clínica causada por uma constituição cromossômica anormal na qual há uma duplicação, uma perda ou um rearranjo de material cromossômico.

Distúrbio ecogenético Um distúrbio resultante da interação de uma predisposição genética a uma doença específica com um fator ambiental.

Distúrbio genético Um defeito total ou parcialmente causado por genes.

Distúrbio monogênico Um distúrbio devido a um alelo ou a um par de alelos mutantes em um só locus.

Distúrbios de repetição de trinca (repetição de trinucleotídeos) Doenças causadas quando o número de unidades repetidas de um trinucleotídeo em um determinado gene se expande além de um limiar e interfere na expressão gênica ou funcionamento.

Divisão reducional A primeira divisão meiótica, assim chamada porque neste estágio o número de cromossomos por célula é reduzido de diplóide para haplóide.

DNA (ácido desoxirribonucleico) A molécula que codifica os genes responsáveis pela estrutura e pelo funcionamento dos organismos vivos e permite a transmissão da informação genética de geração para geração.

DNA complementar (cDNA) DNA sintetizado de um molde de RNA mensageiro, pela ação da enzima transcriptase reversa. Ver *DNA genômico* para comparação.

DNA de cópia única O tipo de DNA que constitui a maioria do genoma.

DNA genômico A seqüência de DNA cromossômico de um gene ou segmento de um gene, incluindo a seqüência de DNA de regiões não-codificantes, bem como codificantes. Também, o DNA que foi isolado diretamente de células ou cromossomos ou cópias clonadas de todo ou de uma parte de tal DNA.

DNA intergênico O DNA não-transcrito de função desconhecida que constitui uma grande porção do DNA total no genoma.

DNA mitocondrial (mtDNA) O DNA no cromossomo circular da mitocôndria. O DNA mitocondrial está presente em muitas cópias por célula, é herdado maternamente e evolui de 5 a 10 vezes mais rápido que o DNA genômico.

DNA polimerase Uma enzima que pode sintetizar um novo filamento de DNA, usando um filamento de DNA previamente sintetizado como molde.

DNA repetitivo (repetições) Seqüências de DNA que estão presentes em múltiplas cópias do genoma.

DNA satélite DNA contendo muitas repetições em tandem de uma curta unidade básica repetida. Não confundir com *satélites cromossômicos*, a cromatina na ponta distal dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos.

Doença responsiva a co-fator Uma doença genética na qual uma anomalia bioquímica específica, que afeta uma única proteína mutante (em geral uma enzima), é corrigida pela administração de quantidades farmacológicas do co-fator específico da proteína mutante (p ex., homocistinúria responsiva à vitamina B_6).

Dominante Uma característica é dominante se for fenotipicamente expressa nos heterozigotos.

Domínio Uma região da seqüência de aminoácidos de uma proteína que pode ser igualada a uma determinada função.

Domínio pareado Um motivo de ligação ao DNA encontrado nos membros de uma grande classe de fatores de transcrição de mamíferos codificado pelos genes PAX. Designado originalmente para o gene *pareado de Drosophila*, no qual foi descrito primeiro.

Dosagem gênica O número de cópias de um determinado gene no genoma.

Ectoderme Uma das três camadas primárias do embrião inicial. Começa na camada mais externa do saco vitelino e dá origem ao sistema nervoso, à pele e aos derivados da crista neural, tais como as estruturas craniofaciais e os melanócitos.

Efeito do fundador Uma freqüência alta de um gene mutante em uma população fundada por um pequeno grupo ancestral quando um ou mais dos fundadores era portador do gene mutante.

Endoderme Uma das três camadas primárias do embrião inicial. Origina o tubo digestivo, o fígado e partes do sistema urogenital.

Endogamia A reprodução de pessoas proximamente aparentadas. A prole de parentes próximos é dita *endogâmica*.

Endonuclease de restrição (enzima de restrição) Uma enzima, derivada de bactéria, que pode reconhecer uma seqüência específica de DNA e clivar a molécula de DNA dentro do sítio de reconhecimento ou em algum sítio próximo.

Enzimopatia Um distúrbio metabólico que resulta da deficiência ou anomalia de uma enzima específica.

Epigenético O termo refere-se a qualquer fator que possa afetar o fenótipo sem mudança do genótipo.

Epistasia A situação na qual um alelo de um gene pode bloquear a expressão fenotípica de todos os alelos de outro gene.

Erro de replicação positivo Um fenótipo de células cancerosas no qual a perda de função de genes de reparo malpareados causam erros tais como a não-correção de um malpareamento quando são replicadas seqüências microssatélites. Estes erros levam a um mosaicismo de tecido, de modo que o câncer parece conter mais de dois alelos em muitos loci pequenos polimórficos de repetição em tandem.

Erro inato do metabolismo Um distúrbio bioquímico geneticamente determinado, no qual um defeito proteico específico produz um bloqueio metabólico que pode ter conseqüências patológicas.

Especificação O primeiro estágio de comprometimento, no qual uma célula seguirá seu programa desenvolvimental se explantada, mas ainda pode ser reprogramada para um destino diferente se transplantada para uma parte diferente do embrião.

Especificidade Em testes diagnósticos, a freqüência com a qual um resultado de teste é negativo quando a doença está ausente.

Esporádica Em genética médica, uma doença causada por uma nova mutação.

Estratificação A situação na qual uma população contém um número de subgrupos cujos membros não se reproduzem livre e aleatoriamente com os membros de outros subgrupos.

Estrutura primária A seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo.

Estrutura terciária Configuração tridimensional.

Estudo de controle de casos Um método epidemiológico no qual os pacientes com uma doença (os casos) são comparados com pessoas adequadamente escolhidas sem a doença (os controles) com relação à freqüência relativa de vários fatores hipotéticos de risco.

Eucarionte Um organismo unicelular ou multicelular no qual as células têm um núcleo com uma membrana nuclear e outras características especializadas. Ver também *procarionte*.

Eucromatina O principal componente da cromatina. Cora-se fracamente com o bandeamento G, descondensando-se e ficando de coloração clara durante a interfase. Contrasta com *heterocromatina*

Eugenia O aumento da prevalência de características desejáveis em uma população pela diminuição da freqüência de alelos deletérios em loci relevantes por meio de cruzamentos controlados, seletivos. O oposto é a *disgenia*.

Euplóide Qualquer número cromossômico que seja um múltiplo exato do número em um gameta haplóide (n). A maioria das células somáticas é diplóide (2n). Contrasta com *aneuplóide*.

Evolução clonal O processo de várias etapas de sucessivas mudanças genéticas que ocorre em uma população de células tumorais em desenvolvimento.

Exclusão alélica Em imunogenética, a observação de que apenas um do par de alelos parentais para cada cadeia H e L de uma molécula de imunoglobulina se expressa dentro de uma única célula.

Éxon Uma região transcrita de um gene que está presente em um RNA mensageiro final

Expressão dessincrônica Expressão de um gene em uma época em que normalmente não é expresso.

Expressão ectópica Expressão de um gene em locais onde ele normalmente não é expresso.

Expressividade A extensão na qual se expressa um defeito genético. Se houver uma expressividade variável, a característica poderá variar em expressão de branda a grave, mas nunca será completamente não-expressa nas pessoas que tiverem o genótipo correspondente. Contrasta com *penetrância*.

Família gênica Um conjunto de genes contendo éxons correlatos, indicando que os genes se desenvolveram de um gene ancestral por duplicação e subseqüente divergência

Família L1 Uma classe de DNA repetitivo feita de longas seqüências intercalares, de até 6 kb de tamanho, ocorrendo em centenas de milhares de cópias no genoma.

Familial Qualquer característica que seja mais comum nos parentes de uma pessoa afetada do que na população em geral, seja a causa genética, ambiental ou ambas.

Farmacogenética A área da genética bioquímica envolvida com as respostas a drogas e suas variações geneticamente controladas.

Farmacogenômica A aplicação de informações ou métodos genômicos para problemas farmacogenéticos.

Fase Em um indivíduo heterozigoto em dois loci sintênicos, a designação de qual alelo no primeiro locus e qual alelo no segundo locus estão no mesmo cromossomo. Ver *acoplamento*

Fator de transcrição Uma de uma grande classe de proteínas que regulam a transcrição formando grandes complexos com outros fatores de transcrição e RNA polimerase. Estes complexos então se ligam a regiões regulatórias de genes para promover ou inibir a transcrição

Fenocópia Uma imitação de um fenótipo que geralmente é determinada por um genótipo específico, produzida pela interação de algum fator ambiental com um genótipo normal.

Fenótipo As características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas observadas de um indivíduo, determinadas por seu genótipo e o ambiente no qual se expressa. Também, em um sentido mais limitado, as anomalias resultantes de um gene mutante particular.

Fertilização *in vitro* Uma tecnologia reprodutiva na qual os espermatozóides são postos para fertilizar um ovócito em cultura de tecidos, e os ovócitos fertilizados são reintroduzidos no útero para permitir a implantação.

Fetoscopia Uma técnica para a visualização direta do feto

Filamento anti-sentido do DNA O filamento de DNA não-codificante, que é complementar ao mRNA e serve como molde para a síntese do RNA. Também chamado, mais corretamente, de *filamento transcrito*.

Filamento codificante Na dupla hélice de DNA, o filamento que tem o mesmo sentido 5' - 3' (e seqüência, exceto que no mRNA U substitui T) que o mRNA. O filamento codificante é o filamento que *não* é transcrito pela RNA polimerase. Também chamado de *filamento com sentido*.

Filamento com sentido Ver *filamento codificante*.

Filamento não-codificante Ver *filamento anti-sentido do DNA*

FISH Hibridização *in situ* com fluorescência. Ver *hibridização in situ*

Fluxo gênico Difusão gradual de genes de uma população para outra através de uma barreira. A barreira pode ser física ou cultural e pode ser rompida por migração ou mistura.

Fração de recombinação (θ) A fração da prole de um genitor heterozigoto em dois loci que herdou um cromossomo levando uma recombinação entre os loci

Fundo genético O genótipo total dentro do qual um genótipo específico se expressa.

Gameta Uma célula reprodutiva (ovócito ou espermatozóide) com um número haplóide de cromossomos.

Gêmeos dizigóticos (DZ) Gêmeos produzidos por dois ovócitos separados, fecundados separadamente. Também chamados de *gêmeos fraternos*.

Gêmeos monozigóticos (MZ) Gêmeos derivados de um único zigoto e, portanto, geneticamente idênticos. Também chamados de *gêmeos idênticos*.

Gene Uma unidade hereditária; em termos moleculares, uma seqüência de DNA que é necessária para a produção de um produto funcional.

Gene candidato Na procura de um gene de doença, um gene candidato é aquele cujo produto tem propriedades bioquímicas ou outras que sugerem que ele pode ser comprovado como sendo o gene da doença que está sendo procurado

Gene estrutural Um gene que codifica qualquer RNA ou produto proteico.

Gene homeobox Um gene que contém uma seqüência conservada de 180 pares de bases em sua região codificante, chamada *homeobox*, codificando um motivo proteico conhecido como *homeodomínio*. Os 60 aminoácidos do homeodomínio são um motivo de ligação ao DNA, o que é consistente com o papel das proteínas homeodomínio na regulação transcricional dos genes envolvidos no desenvolvimento. Ver *domínio pareado*

Gene modificador Um gene que altera o fenótipo associado a mutações em um gene não-alélico.

Gene regulador Um gene que codifica um RNA ou uma molécula de proteína que regula a expressão de outros genes.

Gene supressor tumoral Um gene normal envolvido na regulação da proliferação celular. Mutações recessivas podem levar ao desenvolvimento tumoral, como no gene do retinoblastoma ou o gene p53. Contrasta com *oncogene*

Genes de manutenção Genes expressos na maioria ou em todas as células, pois seus produtos fornecem funções básicas

Genes de manutenção (*caretaker*) Genes supressores tumorais que estão indiretamente envolvidos no controle da proliferação celular pelo reparo de danos no DNA e pela manutenção da integridade genômica, protegendo, portanto, os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais de mutações que possam levar ao câncer

Genes homólogos (homólogos) Refere-se a genes em uma única espécie, ou em espécies diferentes, que têm seqüências de DNA similares, que podem ter funções bioquímicas correlatas e que surgiram de um gene ancestral comum. Os genes ortólogos e parólogos são tipos de genes homólogos, mas seu significado é mais restrito.

Genes protetores (*gatekeeper*) Genes supressores tumorais que regulam diretamente a proliferação celular.

Genética Determinada por genes. Não confundir com *congênita*

Genética de células somáticas O estudo de fenômenos genéticos em células somáticas cultivadas

Genocópia Um genótipo que determina um fenótipo muito similar ao determinado por um genótipo diferente.

Genoma A completa seqüência de DNA, contendo toda a informação genética de um gameta, de uma pessoa, de uma população ou de uma espécie.

Genômica O campo da genética envolvido com os estudos estruturais e funcionais do genoma

Genótipo (1) A constituição genética de uma pessoa, distinta pelo fenótipo. (2) Mais especificamente, os alelos presentes em um locus

Grupo sanguíneo O fenótipo produzido por antígenos geneticamente determinados em uma hemácia. Os antígenos formados por um conjunto de genes alélicos constituem um sistema de grupo sanguíneo.
Haplóide O número de cromossomos de um gameta normal, com apenas um membro de cada par cromossômico. Nos humanos, o número haplóide é 23.
Haploinsuficiência Uma causa de doença genética na qual a contribuição de um alelo normal é insuficiente para evitar a doença em virtude de uma mutação de perda de função no outro alelo.
Haplótipo Um grupo de alelos em acoplamento em loci bem próximos, em geral herdados como uma unidade.
Hemizigoto Um termo para o genótipo de uma pessoa com apenas um representante de um cromossomo ou segmento cromossômico em vez dos dois usuais. Refere-se especificamente a genes ligados ao X no homem, mas também se aplica a genes em qualquer segmento cromossômico que seja deletado no cromossomo homólogo.
Herança complexa Um padrão de herança que não é mendeliana. Uma característica com herança complexa em geral resulta de alelos em mais de um locus interagindo com fatores ambientais.
Herança materna A transmissão de informações genéticas apenas pela mãe.
Herança mitocondrial A herança de uma característica codificada no genoma mitocondrial. Como o genoma mitocondrial é de herança estritamente materna, a herança mitocondrial ocorre apenas pela linhagem feminina.
Herança multifatorial O tipo de herança não-mendeliana apresentado por características que são determinadas por uma combinação de múltiplos fatores, genéticos e ambientais. Também chamada de *herança complexa*.
Herdabilidade (h^2) A fração da variança fenotípica total de uma característica quantitativa que se deva a diferenças genotípicas. Pode ser vista como uma estimativa estatística da contribuição hereditária para uma característica quantitativa.
Heredograma (*pedigree*) Em genética médica, uma história familiar de uma condição hereditária ou um diagrama de uma história familiar indicando os membros familiares, seu parentesco com o probando e sua condição com relação a uma determinada condição hereditária.
Heterocárion Uma célula com dois núcleos separados, formada pela fusão de duas células geneticamente diferentes. Contrasta com *homocárion*.
Heterocromatina Cromatina que se cora fortemente durante o ciclo celular, mesmo na interfase. Em geral tida como sendo de replicação tardia e geneticamente inativa. O DNA satélite em regiões tais como centrômeros, braços curtos acrocêntricos e 1qh, 9qh, 16qh e Yqh constituem *heterocromatina constitutiva*, enquanto a cromatina do cromossomo X inativo é chamada de *heterocromatina facultativa*. Contrasta com *eucromatina*.
Heterogeneidade Ver *heterogeneidade alélica, heterogeneidade clínica, heterogeneidade genética, heterogeneidade de locus*.
Heterogeneidade alélica Em uma população, pode haver vários alelos mutantes diferentes em um só locus. Em um indivíduo, o mesmo fenótipo — ou fenótipos similares — pode ser causado por alelos mutantes diferentes em vez de alelos idênticos do locus.
Heterogeneidade clínica O termo que descreve a ocorrência de fenótipos clinicamente diferentes por mutações no mesmo gene.
Heterogeneidade de locus A produção de fenótipos idênticos por mutações em dois ou mais loci diferentes.
Heterogeneidade genética A produção do mesmo fenótipo ou de fenótipos similares por mecanismos genéticos diferentes. Ver *heterogeneidade alélica, heterogeneidade clínica, heterogeneidade de locus*.
Heteromorfismo Uma variante normal morfológica ou de coloração de um cromossomo.
Heteroplasmia A presença de mais de um tipo de DNA mitocondrial nas mitocôndrias de uma única pessoa. Contrasta com *homoplasmia*.
Heteroplóide Qualquer número de cromossomos que não o normal.
Heterozigota manifestante Uma mulher heterozigota para um distúrbio ligado ao X na qual, devido à inativação não-aleatória do X, a característica é expressa clinicamente com quase o mesmo grau de gravidade que nos homens hemizigotos afetados.
Heterozigoto Um indivíduo ou genótipo com dois alelos diferentes em um determinado locus em um par de cromossomos homólogos.
Heterozigoto duplo Um indivíduo que é heterozigoto em cada um de dois loci diferentes. Contrasta com *heterozigoto composto*.
Heterozigoto obrigatório Um indivíduo que pode não ser afetado clinicamente, mas que, com base na análise do heredograma, deve ser portador de um alelo mutante específico.
Hibridização Em biologia molecular, a ligação de duas moléculas de ácidos nucleicos unifilamentares complementares de acordo com as regras de pareamento de bases. Em genética de células somáticas, a fusão de células somáticas, em geral de organismos diferentes, para formar uma célula híbrida contendo a informação genética de ambos os tipos celulares parentais.
Hibridização genômica comparativa (CGH) Uma técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) usada para comparar duas amostras diferentes de DNA em termos de dosagem gênica, especialmente útil no estudo de mudanças cromossômicas nas células cancerosas.
Hibridização *in situ* Mapeamento de um gene por hibridização molecular de uma seqüência de DNA clonado, marcada por radioatividade ou fluorescência, em uma dispersão cromossômica ou núcleo celular em uma lâmina.
Histocompatibilidade Um hospedeiro aceitará um determinado enxerto apenas se for histocompatível, isto é, se o enxerto não contiver antígenos que faltam no hospedeiro.
Histonas Proteínas associadas ao DNA nos cromossomos que são ricos em aminoácidos básicos (lisina ou arginina) e virtualmente invariantes na evolução eucariótica.
Holoenzima O composto funcional formado pela ligação de uma apoenzima e sua coenzima apropriada.
Homocárion Uma célula derivada da fusão de duas células geneticamente idênticas. Contrasta com *heterocárion*.
Homoplasmia A presença de apenas um tipo de DNA mitocondrial nas mitocôndrias de um único indivíduo. Contrasta com *heteroplasmia*.
Homozigoto Um indivíduo ou genótipo com alelos idênticos em um determinado locus em um par de cromossomos homólogos.
Hospedeiro Em genética molecular, o organismo no qual é isolada e cultivada uma molécula de DNA recombinante. Geralmente *Escherichia coli* ou levedura.
Idênticos por descendência Dois indivíduos de uma família que têm os mesmos alelos em um locus, pois os herdaram de um ancestral comum. Ver *coeficiente de endogamia*.
Ilha de CG (ou de CpG) Qualquer região do genoma que contenha uma concentração incomumente alta da seqüência de dinucleotídeo 5′-CG-3′.
Imprinting O fenômeno de expressão diferencial de alelos dependendo do genitor de origem. Ver *síndrome de Prader-Willi* e *síndrome de Angelman*, no texto, para exemplos.
Inativação do X Inativação de genes no cromossomo X nas células somáticas de fêmeas de mamíferos, ocorrendo cedo na vida embrionária, por volta da implantação. Ver *lyonização*.
Incompletamente dominante Uma característica que é herdada de modo dominante, mas é mais grave em um homozigoto que em um heterozigoto.
Indução A determinação do destino de uma região de um embrião por sinais extracelulares de uma segunda região, em geral vizinha.
Influenciada pelo sexo Uma característica que não tem um padrão de herança ligada ao X, mas que se expressa diferentemente, seja em grau ou em freqüência, nos homens e nas mulheres.
Inserção Em biologia molecular, um fragmento de DNA clonado em um vetor; em citogenética, uma anomalia cromossômica na qual um segmento de DNA de um cromossomo é inserido em um cromossomo não-homólogo.
Interfase O estágio do ciclo celular entre duas mitoses sucessivas.
Íntron Um segmento de um gene que é inicialmente transcrito, mas é então removido de dentro do RNA primário transcrito, havendo a recomposição das seqüências (éxons) em ambos os lados dele.
Inversão Um rearranjo cromossômico no qual um segmento de um cromossomo é revertido de ponta a ponta. Se o centrômero estiver incluído na inversão, ela é *pericêntrica*; caso não, é *paracêntrica*.

Isocromossomo Um cromossomo anormal no qual um braço é duplicado (formando dois braços de tamanho igual, com os mesmos loci em seqüência inversa) e o outro braço está ausente

Isolado Uma subpopulação na qual as reproduções ocorrem exclusiva ou geralmente entre membros da mesma subpopulação

Isotipo Em imunologia, refere-se às cinco classes diferentes estrutural e funcionalmente de cadeias pesadas de imunoglobulinas, chamadas gama, alfa, mu, delta e epsilo, com as correspondentes imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE

kb (quilobase) Uma unidade de 1 000 bases em uma seqüência de DNA ou RNA.

Lei de Hardy-Weinberg A lei que correlaciona a freqüência gênica com a freqüência do genótipo, usada em genética de populações para determinar a freqüência alélica e a freqüência de heterozigotos quando a incidência de um distúrbio é conhecida

Letal genético Um gene ou uma característica geneticamente determinada que leva a não se reproduzir, embora não necessariamente à morte precoce

Ligação Em biologia molecular, o processo de união de duas moléculas bifilamentares de DNA para formar uma molécula de DNA recombinante, por meio de ligações fosfodiéster, usando a enzima DNA ligase

Ligação (ligados) Genes no mesmo cromossomo estão *ligados* se forem transmitidos juntos na meiose com mais freqüência que o acaso permitiria. Comparar com *sintenia*

Ligação ao X O padrão distinto de herança de alelos em loci do cromossomo X que não sofrem recombinação (crossing over) durante a meiose masculina

Ligação ao Y Genes no cromossomo Y, ou características determinadas por tais genes, são ligadas ao Y

Ligado ao sexo Termo antigo para *ligado ao X*, hoje pouco usado, pois formalmente não distingue a ligação ao X da ligação ao Y

Limitada ao sexo Uma característica que é expressa em apenas um sexo, embora o gene que determina a característica não seja ligado ao X

Linhagem A prole de uma célula, em geral determinada pela marcação experimental da célula, de modo que todas as suas descendentes podem ser identificadas. Ver *clone*.

Linhagem germinativa A linhagem celular da qual se derivam os gametas.

Locus A posição ocupada por um gene em um cromossomo. Formas diferentes do gene (*alelos*) podem ocupar o locus

Lyonização Termo usado para o fenômeno de inativação do X, que foi descrito pela primeira vez pela geneticista Mary Lyon. Ver *inativação do X*.

Malpareamento de repetição Um mecanismo mutacional que ocorre durante a replicação do DNA de seqüências com repetições de um ou mais nucleotídeos, na qual uma repetição em um filamento faz um pareamento errado com uma repetição similar no filamento complementar, gerando uma deleção ou expansão do número de repetições.

Mapa de ligação Um mapa cromossômico mostrando as posições relativas dos genes e outros marcadores de DNA nos cromossomos, como determinado pela análise de ligação

Mapa de restrição Uma disposição linear de sítios no DNA clivados por várias endonucleases de restrição.

Mapa físico Um mapa mostrando a ordem dos genes e marcadores ao longo do cromossomo e suas distâncias em unidades tais como bandas citogenéticas ou pares de bases. O mapeamento físico é feito por técnicas tais como o mapeamento híbrido de radiação, a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e o seqüenciamento de nucleotídeos, não por dados de análise de ligação. Ver *mapa genético* para comparação

Mapa genético As posições relativas dos genes nos cromossomos, como mostrado pela análise de ligação. Ver *mapa físico* para comparação.

Mapa gênico A disposição característica dos genes nos cromossomos. O mapeamento dos genes em suas posições cromossômicas tem sido um propósito do Projeto do Genoma Humano

Mapeamento híbrido de radiação Um método de mapeamento gênico que usa a hibridização de células somáticas para transferir pequenos fragmentos cromossômicos gerados por raios X em células hospedeiras.

Marcador genético Um locus que tenha alelos facilmente classificáveis e que possa ser usado em estudos genéticos. Pode ser um gene ou um sítio de enzima de restrição, bem como qualquer característica do DNA que permita que versões diferentes de um locus (ou seu produto) sejam distintas umas das outras e seguidas nas famílias. Ver *polimorfismo*.

Marcador microssatélite Ver *polimorfismo de pequena repetição em tandem (STRP)*

Massa celular interna Um pequeno grupo de células no embrião pré-implantação de mamíferos que se tornará o ectoderma primitivo (ou epiblasto) após a implantação e, finalmente, originará o embrião e não a placenta.

Matriz de leitura Um dos três modos possíveis de leitura de uma seqüência de nucleotídeos como uma série de trincas. Uma *matriz de leitura aberta* não tem códons de término e, portanto, é potencialmente traduzível em proteína.

Matriz de leitura aberta O intervalo entre os códons inicial e final de uma seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína.

Meiose O tipo de divisão celular que ocorre nas células germinativas, pelo qual os gametas que contêm o número haplóide de cromossomos são produzidos a partir de células diplóides. Ocorrem duas divisões meióticas: meiose I e meiose II. A redução do número de cromossomos ocorre durante a meiose I.

Mesoderme A camada germinativa média no embrião inicial. A fonte de células que formarão os ossos, os músculos, o tecido conjuntivo, o coração, o sistema hematopoético, os rins e outros órgãos.

Metacêntrico Um tipo de cromossomo com um centrômero central e braços de tamanhos aparentemente iguais.

Metáfase O estágio da mitose ou meiose no qual os cromossomos atingiram a máxima condensação e estão alinhados na placa equatorial da célula, ligados às fibras do fuso. Este é o estágio no qual os cromossomos são mais facilmente examinados.

Metástase Dispersão de células malignas para outros locais do corpo

Metemoglobina A forma oxidada de hemoglobina, contendo ferro no estado férrico e não no ferroso, que é incapaz de ligar oxigênio.

Metilação do DNA Nos eucariontes, a adição de uma metila na posição 5 do anel pirimidínico de uma base citosina no DNA para formar uma 5-metilcitosina.

Método do membro afetado no heredograma Um método livre de modelo para análise de ligação que avalia sistematicamente se os parentes afetados por uma doença compartilham genes em um locus com mais freqüência do que seria previsto apenas pelo acaso em seu parentesco familiar. Se os parentes forem irmãos, chama-se *método do par de irmãos afetados* da análise de ligação.

Microdeleção Uma deleção cromossômica que é muito pequena para ser vista ao microscópio. Ver também *síndrome de genes contíguos*

Mitose O processo comum de divisão celular, que resulta na formação de duas células geneticamente idênticas à célula parental.

Modelo de dois eventos A hipótese de que algumas formas de câncer podem ser iniciadas quando ambos os alelos de um gene supressor tumoral tornam-se inativados na mesma célula.

Mola hidatidiforme Uma anomalia da placenta na qual ela cresce e se assemelha a um cisto hidático ou cacho de uvas, associado a um desenvolvimento fetal muito anormal. Em uma *mola completa*, o cariótipo é 46,XX, representando a duplicação de cromossomos do espermatozóide sem contribuição materna. Uma *mola parcial* é triplóide, geralmente com um conjunto cromossômico paterno extra

Monossomia Uma constituição cromossômica na qual um membro de um par cromossômico está ausente, como na síndrome de Turner 45,X.

Morfogênese O processo pelo qual as mudanças na forma da célula, adesão, movimento e número levam à estrutura tridimensional.

Morfógeno Uma substância produzida durante o desenvolvimento em uma região localizada do organismo que se difunde para formar um gradiente de concentração e dirigir as células para duas ou mais vias específicas de desenvolvimento, dependendo de sua concentração.

Mosaicismo germinativo Em uma pessoa, a presença de dois ou mais tipos geneticamente diferentes de células da linhagem germinativa, resultando de mutação durante a proliferação e diferenciação da linhagem germinativa.

Mosaicismo placentário confinado O mosaicismo em uma amostra de vilosidades coriônicas (CVS) obtida da placenta que não está presente no feto em si.

Mosaico Um indivíduo ou tecido com pelo menos duas linhagens celulares que diferem em genótipo ou cariótipo, derivadas de um único zigoto. Não confundir com *quimera*.

Mudança de globina Mudança na expressão de vários genes de globina durante a ontogenia.

Mudança de matriz de leitura Uma mutação envolvendo uma deleção ou uma inserção que não é um múltiplo inteiro de três pares de bases e, portanto, muda a matriz de leitura do gene em seguida à mutação.

Multiplex Um heredograma no qual há mais de um caso de um determinado distúrbio.

Mutação Qualquer alteração herdável permanente na seqüência do DNA genômico.

Mutação cromossômica Uma alteração no material genético no nível cromossômico.

Mutação de ganho de função Uma mutação associada a um aumento em uma ou mais das funções normais de uma proteína. Distinta de *mutação de propriedade nova*.

Mutação de perda de função Uma mutação associada a uma redução ou perda completa de uma ou mais das funções normais de uma proteína.

Mutação de ponto Uma única mudança de par de bases de nucleotídeos no DNA.

Mutação de propriedade nova Uma mutação que confere uma nova propriedade à proteína.

Mutação de sentido trocado Uma mutação que muda um códon específico para um aminoácido codificar outro aminoácido.

Mutação de término de cadeia Uma mutação que gera um códon finalizador, impedindo assim a continuação da síntese da cadeia polipeptídica.

Mutação de transição A substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina.

Mutação privada Uma mutação muito rara, talvez conhecida apenas em uma única família ou em uma única população.

Mutação sem sentido Uma única substituição de bases no DNA que resulta em um códon de término de cadeia.

Mutação somática Uma mutação que ocorre em uma célula somática, em vez de germinativa.

Mutágeno Um agente que aumenta a taxa de mutação espontânea causando mudanças no DNA.

Mutante Um gene que foi alterado por mutação. Também usado para se referir a um organismo não-humano portador de um gene mutante.

Não-disjunção A falha de separação de dois membros de um par cromossômico durante a meiose I ou de duas cromátides de um cromossomo durante a meiose II ou mitose, de modo que ambos passam para uma célula filha e a outra célula não recebe nenhum.

Negativo dominante Um alelo causador de doença, ou o efeito de tal alelo, que perturba o funcionamento de um alelo tipo selvagem na mesma célula.

Neoplasia Um crescimento anormal produzido pelo desequilíbrio entre a proliferação celular normal e o atrito celular normal. Pode ser benigna ou maligna (câncer).

Nucleossomo A unidade de estrutura primária da cromatina, consistindo em 146 pares de bases de DNA envolvendo quase duas vezes um cerne de oito moléculas de histona.

Nucleotídeo Uma molécula composta de uma base nitrogenada, um açúcar de 5 carbonos e um grupo fosfato. Um ácido nucleico é um polímero de muitos nucleotídeos.

Oligonucleotídeo Uma molécula curta de DNA (em geral de 8 a 50 pares de bases), sintetizada para uso como uma sonda ou para uso na reação em cadeia da polimerase.

Oligonucleotídeo alelo-específico (ASO) Uma sonda oligonucleotídica sintetizada para se parear exatamente a uma determinada seqüência de DNA e permitir a discriminação dos alelos que diferem por apenas uma base.

Oncogene Um gene de ação dominante envolvido no crescimento celular desregulado e na proliferação, responsável pelo desenvolvimento de um tumor. A mutação, a hiperexpressão ou a amplificação de oncogenes nas células somáticas pode levar à transformação neoplásica. Contrasta com *proto-oncogene* e com *gene supressor tumoral*.

Ontogenia A história desenvolvimental de um organismo.

Ortólogos Refere-se a genes em espécies diferentes que são similares em seqüência de DNA e também codificam proteínas que têm a mesma função, pelo menos no nível bioquímico, em cada espécie. Os genes ortólogos originam-se do mesmo gene em um ancestral comum. Contrasta com *parálogos*.

p Em citogenética, o braço curto de um cromossomo (do idioma francês *petit*). Em genética de populações, a freqüência do alelo mais comum de um par. Em bioquímica, a abreviação de *proteína* (p. ex., p53 é uma proteína com 53 quilodáltons de tamanho).

PACs (cromossomos artificiais P1) Vetores capazes de clonar inserções de DNA de 100 a 300 kb de tamanho, usados em mapeamento de alta resolução e seqüenciamento gênico.

Palíndromo Em biologia molecular, uma seqüência de nucleotídeos na qual a seqüência de 5′ para 3′ de um filamento de um segmento de DNA é a mesma que a de seu filamento complementar. Os sítios das enzimas de restrição em geral são palíndromos.

Par de bases (pb) Um par de bases nucleotídicas complementares, como na dupla hélice do DNA. Usado como unidade de medida do tamanho de uma seqüência de DNA.

Parálogos Refere-se a dois ou mais genes em uma única espécie que são similares em seqüência de DNA e provavelmente codificam proteínas com funções similares e talvez superpostas, mas não idênticas. Os genes parálogos provavelmente se originaram de um gene ancestral comum. Exemplo, genes de globina α e β.

Parentesco Uma família ampliada.

PCR Ver *reação em cadeia da polimerase*.

Penetrância A fração de indivíduos com um genótipo conhecido como causador de uma doença que têm alguns sinais ou sintomas da doença. Contrasta com *expressividade*.

Perda de heterozigose (LOH) Perda de um alelo normal de uma região de um cromossomo de um par, permitindo que um alelo defectivo no cromossomo homólogo seja clinicamente manifesto. Uma característica de muitos casos de retinoblastoma, câncer de mama e outros tumores decorrentes de mutação em um gene supressor tumoral.

Plasmídeos Moléculas extracromossômicas de DNA circular de replicação independente em bactérias ou leveduras, usadas em biologia molecular como vetores para segmentos clonados de DNA.

Pleiotropia Efeitos fenotípicos múltiplos de um único gene ou par de genes. O termo é usado particularmente quando os efeitos não estão obviamente relacionados.

Pluripotente Descreve uma célula embrionária que é capaz de originar tipos diferentes de tecidos diferenciados ou estruturas, dependendo de sua localização e influências ambientais.

Poligênica Herança determinada por muitos genes em loci diferentes, com pequenos efeitos aditivos. Não confundir com herança (*multifatorial*) *complexa*, na qual fatores ambientais bem como genéticos podem estar envolvidos.

Polimorfismo A ocorrência conjunta em uma população de dois ou mais genótipos alternativos, cada um com uma freqüência maior que a que pode ser mantida apenas pela mutação recorrente. Um locus é arbitrariamente considerado como sendo polimórfico se o alelo mais raro tiver uma freqüência de 0,01, de modo que a freqüência de heterozigotos seja de pelo menos 0,02. Qualquer alelo mais raro que isto é uma *variante rara*.

Polimorfismo balanceado Um polimorfismo mantido na população pela vantagem do heterozigoto, permitindo que um alelo, mesmo que seja deletério no estado homozigoto, persista em freqüência relativamente alta na população.

Polimorfismo benigno Um polimorfismo para o qual os fenótipos diferentes são todos clinicamente normais, por exemplo, o polimorfismo do grupo sanguíneo ABO.

Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) Uma diferença polimórfica na seqüência de DNA entre indivíduos que podem ser reconhecidos por endonucleases de restrição. Ver *polimorfismo*.

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) Um polimorfismo na seqüência de DNA que consiste na variação em uma única base.

Polimorfismo de pequena repetição em tandem (STRP) Um locus polimórfico que consiste em um número variável de unidades bi-, tri-, ou tetranucleotídicas repetidas em tandem, tais como $(TG)_n$, $(CAA)_n$ ou $(GATA)_n$. Números diferentes de unidades constituem alelos diferentes. Também chamado de *marcador microssatélite*

Poliplóide Qualquer múltiplo do número básico haplóide de cromossomos que não o número diplóide; 3n, 4n e assim por diante.

Ponto de controle Posições no ciclo celular, geralmente entre os estágios G_1 e S ou G_2 e M, nas quais a célula determina se continua para o estágio seguinte do ciclo.

***Pool* de genes** Todos os alelos presentes em um determinado locus ou, mais amplamente, em todos os loci na população

Portador Um indivíduo heterozigoto para um determinado alelo mutante. O termo é usado para heterozigotos para alelos autossômicos recessivos, para mulheres heterozigotas para genes ligados ao X ou, menos comumente, para uma pessoa heterozigota para um alelo autossômico dominante, mas que não o expressa (p. ex., um heterozigoto para o alelo da doença de Huntington no estágio pré-sintomático)

Pré-mutação Nos distúrbios de repetição de trincas — por exemplo, na síndrome do X frágil — uma expansão moderada do número de repetições de trincas que não tem efeito fenotípico, mas corre um risco aumentado de sofrer mais expansão durante a meiose e causar a expressão total do distúrbio na prole.

Primer Um oligonucleotídeo curto destinado a hibridizar-se a um molde unifilamentar de DNA e criar uma ponta de DNA livre, à qual a DNA polimerase pode adicionar bases e sintetizar um DNA complementar ao molde.

Probabilidade condicional Na análise bayesiana, esta é a chance de um resultado observado, tendo em vista que o consulente tem um determinado genótipo. O produto das probabilidades *a priori* e condicional é a probabilidade conjunta.

Probando O membro afetado da família por meio do qual a família é avaliada. Também chamado de *propósito* ou *caso índice*.

Procarionte Um organismo unicelular simples, tal como uma bactéria, sem um núcleo separado. Ver *eucarionte*.

Prófase O primeiro estágio da divisão celular, durante o qual os cromossomos tornam-se visíveis como estruturas distintas e subseqüentemente se espessam e encurtam. A prófase da primeira divisão meiótica é ainda caracterizada pelo pareamento (sinapse) dos cromossomos homólogos.

Programa de desenvolvimento O processo pelo qual uma célula de um embrião atinge seu destino

Projeto do Genoma Humano O principal projeto atual de pesquisa, de escopo internacional, para mapear e seqüenciar todo o genoma humano e aqueles de organismos-modelo

Prole Todos os irmãos em uma família.

Promotor Uma seqüência de DNA situada na ponta 5' de um gene, na qual é iniciada a transcrição.

Proporção das chances Uma comparação das chances de indivíduos que compartilham um determinado fator (p. ex., um genótipo, uma exposição ambiental ou uma droga) terem uma doença ou característica *versus* as chances de um indivíduo que não tem o fator. Nos indivíduos em que o fator está presente, as *chances* de serem afetados = (a/c). Nos indivíduos nos quais o fator está ausente, as *chances* de serem afetados = (b/d) e a proporção das chances = (a/c)/(b/d) = ad/bc. Ver *risco relativo*.

	Fator Presente	*Fator Ausente*	*Total*
Afetado	a	b	a + b
Não-afetado	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Proporção de risco relativo (λ_r) Nos distúrbios complexos, o risco de que uma doença ocorra em um parente de uma pessoa afetada, comparado com o risco da doença em qualquer pessoa da população geral

Propósito Ver *probando*.

Proteína estrutural Uma proteína que serve a um papel estrutural no corpo, tal como o colágeno.

Proteínas de manutenção Proteínas expressas em absolutamente todas as células que têm papéis fundamentais na manutenção da estrutura e do funcionamento celular (*versus* proteínas *especializadas*).

Proteínas especializadas Proteínas expressas em apenas um ou em um número limitado de tipos de células, que têm funções únicas que contribuem para a individualidade das células nas quais elas se expressam. Contrasta com *proteínas de manutenção*.

Proteínas *zinc finger* Uma classe de proteínas de transcrição contendo segmentos repetidos em forma de alça que se ligam a átomos de zinco.

Proteômica Um campo da bioquímica que engloba a análise e o catálogo da estrutura e função de todas as proteínas presentes em uma determinada célula ou tecido (o proteoma). É paralela à *genômica*, um enfoque similar para a análise da seqüência de DNA e expressão do mRNA.

Proto-oncogene Um gene normal envolvido em algum aspecto da divisão celular ou proliferação que pode se tornar ativado pela mutação ou outro mecanismo para se tornar um oncogene.

Pseudogene (1) Um gene inativo dentro de uma família de genes, derivado por mutação de um gene ativo ancestral e freqüentemente localizado dentro da mesma região do cromossomo que sua contraparte funcional (*pseudogene não-processado*); (2) uma cópia de DNA de um mRNA, criada por retrotransposição e inserida aleatoriamente no genoma (*pseudogene processado*). Os pseudogenes processados provavelmente nunca são funcionais.

Pseudomosaicismo A ocorrência de uma única célula citogeneticamente anormal em uma análise citogenética de uma amostra de vilosidade coriônica (CVS) ou de amniocentese. Em geral considerado um artefato e sem significado clínico.

Punção de vilosidade coriônica (CVS) Um procedimento usado para diagnóstico pré-natal entre 8 e 10 semanas de gestação. Retira-se tecido fetal para análise da área de vilosidades coriônicas, seja transcervical ou transabdominalmente, sob orientação ultrasonográfica.

q Em citogenética, o braço longo de um cromossomo; em genética de populações, a freqüência do alelo menos comum de um par.

Quiasma Literalmente, um cruzamento. O termo refere-se ao entrecruzamento de filamentos de cromátides dos cromossomos homólogos, visto no diplóteno da primeira divisão meiótica. Os quiasmas são tidos como as evidências de troca de material cromossômico (crossings) entre os membros de um par de cromossomos.

Quimera Uma pessoa composta de células derivadas de dois zigotos geneticamente diferentes. Em humanos, as *quimeras de grupos sangüíneos* resultam de trocas de células-tronco hematopoéticas de gêmeos dizigóticos no útero; as *quimeras dispérmicas*, que são muito raras, resultam da fusão de dois zigotos em um indivíduo. O quimerismo também é um resultado inevitável do transplante.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) Técnica de genética molecular pela qual uma seqüência curta de DNA ou RNA é muito amplificada por meio de dois *primers* oligonucleotídicos flanqueadores usados em ciclos repetidos de ampliação dos *primers* e síntese de DNA pela DNA polimerase.

Rearranjo Quebra cromossômica seguida de reconstituição em uma combinação anormal. Se for *não-balanceado*, o rearranjo pode produzir um fenótipo anormal.

Rearranjo somático Rearranjo das seqüências de DNA nos cromossomos de células precursoras de linfócitos, gerando assim uma diversidade de anticorpos e receptores de células T

Receptor de antígeno de célula T (TCR) Receptor geneticamente codificado na superfície de linfócitos T que reconhece especificamente moléculas de antígeno.

Recessiva Uma característica que é expressa apenas em homozigotos ou hemizigotos.

Recombinação A formação de novas combinações de alelos em acoplamento por crossing entre seus loci

Recombinante Um indivíduo que tem uma nova combinação de alelos não encontrada em ambos os genitores.

Recomposição A remoção dos introns e reunião dos éxons na geração de mRNA maduro a partir do transcrito primário

Redundância A situação na qual os genes (em geral parálogos) têm funções superpostas

Região de controle de locus (LCR) Um domínio de DNA, situado fora de um grupo de genes estruturais, responsável pela expressão apropriada dos genes dentro do grupo.

Região pseudo-autossômica Segmento do cromossomo X e Y, situado na parte mais distal de seus respectivos braços p e q, nos quais ocorre crossing durante a meiose masculina. As características devidas a alelos nos loci pseudo-autossômicos parecerão ser herdadas como autossômicas, a despeito da localização física destes loci nos cromossomos sexuais.

Região reguladora de um gene Um segmento de DNA, tal como um promotor, um acentuador ou uma região controladora de locus, dentro ou perto de um gene que regula a expressão do gene.

Regiões de coloração homogênea (HSRs) Regiões cromossômicas que se coram uniformemente e representam cópias amplificadas de um segmento de DNA.

Repetições em tandem Duas ou mais cópias da mesma (ou muito similar) seqüência de DNA dispostas no mesmo sentido ao longo do cromossomo.

Reprodução aleatória Seleção de um cônjuge sem relação com seu genótipo. Em uma população de reprodução aleatória, as freqüências das várias reproduções são determinadas apenas pelas freqüências dos genes envolvidos.

Restrição de MHC Um fenômeno imunológico no qual uma célula T só responderá a um antígeno se ele estiver presente na superfície de uma célula que compartilha os antígenos do MHC da própria célula T.

Retrovírus Um vírus, com um genoma de RNA, que se propaga pela conversão do RNA em DNA pela enzima transcriptase reversa.

RFLP Ver *polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.*

Ribossomo Uma organela citoplasmática composta de RNA ribossômico e proteína, na qual são sintetizados polipeptídeos com orientação do RNA mensageiro.

Risco A probabilidade de ocorrência de um evento. Em geral calculado como o número de vezes que o evento ocorre dividido pelo número total de oportunidades para que o evento ocorra. Como em todas as probabilidades, o risco varia de 0 a 1.

Risco de recorrência A probabilidade de que um distúrbio genético presente em um ou mais membros de uma família recorra em outro membro da mesma geração ou de uma geração subseqüente

Risco empírico Em genética humana, a probabilidade de que uma característica familiar ocorra ou recorra em um membro familiar, baseada nos números observados de indivíduos afetados e não-afetados nos estudos familiares em vez de no conhecimento do mecanismo causal.

Risco relativo Uma comparação do *risco* de uma doença ou característica nos indivíduos que compartilham um determinado fator (tal como um genótipo, uma exposição ambiental ou uma droga) *versus* o *risco* entre os indivíduos que não têm o fator. O *risco* de ser afetado nos indivíduos que têm o fator = (a/a + c), o *risco* de ser afetado quando o fator está ausente = (b/b + d) e o risco relativo = (a/a + c)/(b/b + d) = a(b + d)/b(a + c). Note que o risco relativo ≅ ad/bc, a proporção das chances, quando a doença é relativamente rara (b < < d e a < < c). Ver *proporção das chances.*

	Fator Presente	*Fator Ausente*	*Total*
Afetado	a	b	a + b
Não-afetado	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

RNA (ácido ribonucleico) Um ácido nucleico formado sobre um molde de DNA, contendo ribose em vez de desoxirribose. O *RNA mensageiro* (*mRNA*) é o molde no qual são sintetizados os polipeptídeos. O *RNA transportador* (*tRNA*), em cooperação com os ribossomos, traz aminoácidos ativados para a posição ao longo do molde de mRNA. O *RNA ribossômico* (*rRNA*), um componente dos ribossomos, funciona como um sítio inespecífico de síntese de polipeptídeos

RNA mensageiro (mRNA) Um RNA, transcrito do DNA de um gene, que determina a seqüência de aminoácidos no polipeptídeo codificado.

RNA polimerase Uma enzima que sintetiza RNA em um DNA molde.

RNA transportador (tRNA) Ver *RNA.*

Satélite cromossômico Uma pequena massa de cromatina contendo genes para RNA ribossômico no final do braço curto de cada cromátide de um cromossomo acrocêntrico. Não confundir com *DNA satélite*

Segregação Em genética, a disjunção de cromossomos homólogos na meiose

Segregação cromossômica A separação de cromossomos ou cromátides na divisão celular, de modo que cada célula filha recebe um número igual de cromossomos.

Seleção Em genética de populações, a operação de forças que determinam a adaptabilidade relativa de um genótipo na população, afetando a freqüência do gene envolvido.

Sensibilidade Em testes diagnósticos, a freqüência com a qual o resultado do teste é positivo quando o distúrbio está presente.

Seqüência (1) Em genômica e genética molecular, a ordem dos nucleotídeos em um segmento de DNA ou RNA. (2) Em genética clínica, um padrão reconhecível de características dismórficas causadas por um número de etiologias diferentes. Diferente de *síndrome malformativa.*

Seqüência de consenso Nos genes ou proteínas, uma seqüência idealizada, na qual cada base ou aminoácido representa aquele encontrado com mais freqüência nesta posição quando são comparadas muitas seqüências. Por exemplo, a seqüência de consenso para os sítios doador ou aceptor de corte.

Seqüência flanqueadora Uma região de um gene que precede ou sucede a região transcrita

Seqüência intercalar Ver *íntron.*

Seqüência marcada expressa (EST) Uma seqüência curta de DNA, derivada do seqüenciamento aleatório de clones de uma biblioteca de cDNA, de tamanho suficiente para identificar unicamente um determinado mRNA.

Seqüência repetida *Alu* No genoma humano, aproximadamente 10% do DNA é feito de um grupo de cerca de 1.000.000 de seqüências dispersas correlatas, cada uma com cerca de 300 pares de bases de tamanho, assim chamadas porque são clivadas pela enzima de restrição *AluI.*

Silenciador Uma seqüência de DNA que atua em *cis* (no mesmo cromossomo) para diminuir a transcrição de um gene vizinho. O silenciador pode estar antes ou em seguida ao gene e pode estar na mesma orientação ou em orientação reversa (contrasta com *acentuador*).

Simplex Em genética humana, o termo usado para descrever uma história familiar com apenas um membro afetado por um distúrbio genético

Sinapse Pareamento de cromossomos homólogos na prófase da primeira divisão meiótica

Síndrome Um padrão característico de anomalias, supostamente com a mesma causa

Síndrome de deformação Um padrão reconhecível de características dismórficas causadas por fatores extrínsecos que afetam o feto no útero.

Síndrome de genes contíguos Uma síndrome que resulta de uma *microdeleção* de DNA cromossômico englobando dois ou mais loci contíguos. Também chamada de *aneussomia segmentar*

Síndrome malformativa Um padrão reconhecível de características dismórficas que têm uma única causa, seja genética ou ambiental.

Sintenia A presença física conjunta no mesmo cromossomo de dois ou mais loci gênicos, estejam ou não próximos o suficiente para ser demonstrada a ligação

Sítio aceptor de corte O limite entre a ponta 3′ de um íntron e a ponta 5′ do éxon seguinte. Também chamado de *sítio de corte 3′.*

Sítio críptico de corte Uma seqüência de DNA similar ao sítio de consenso de corte, mas normalmente não usada. É usada quando o sítio normal de corte está alterado por mutação ou quando uma mutação no sítio críptico aumenta seu uso pelo aparato de recomposição. Pode estar em uma seqüência codificante ou não-codificante

Sítio de poliadenilação Na síntese de um mRNA final, um sítio no qual uma seqüência de 20 a 200 adenosinas (cauda poliA) é adicionada à ponta 3' de um RNA transcrito, ajudando seu transporte para fora do núcleo e, em geral, sua estabilidade.

Sítio de restrição Uma curta seqüência no DNA que pode ser reconhecida e cortada por uma endonuclease de restrição específica.

Sítio de seqüência marcada (STS) Uma curta seqüência de DNA que pode ser amplificada e usada para identificar uma localização específica no mapa físico.

Sítio doador de corte O limite entre a ponta 3' de um éxon e a ponta 5' do íntron seguinte. Também chamado de *sítio de corte 5'*.

Sítio frágil Um espaço não-corado na cromatina de um cromossomo metafásico, tal como o sítio frágil em Xq27 na síndrome do X frágil.

SKY Ver *cariotipagem espectral*

SNP Ver *polimorfismo de nucleotídeo único*.

Solenóide Uma fibra composta de filamentos compactados de nucleossomos, formando a unidade fundamental da organização da cromatina.

Sonda Em genética molecular, uma seqüência marcada de DNA ou RNA usada para detectar a presença de uma seqüência complementar por hibridização molecular; ou um reagente capaz de reconhecer um clone desejado em uma mistura de muitas seqüências de DNA ou RNA. Também, o processo de uso de tal molécula.

Sonda colorida Ver *sonda multicolorida de cromossomos*.

Sonda multicolorida de cromossomos Uma sonda multilocus criada para fluorescer na hibridização *in situ* (FISH) que se hibridiza apenas a um determinado cromossomo ou braço cromossômico.

Submetacêntrico Um tipo de cromossomo com braços de tamanhos diferentes.

Superfamília de genes de imunoglobulina Uma família de genes evolutivamente relacionados, composta de antígeno leucocitário humano (HLA) classe I e genes da classe II, genes de imunoglobulina, genes receptores de células T e outros genes codificantes de moléculas de superfície celular.

TATA box Uma seqüência de consenso na região promotora de muitos genes que está situada a cerca de 25 pares de bases antecedentes do ponto de início da transcrição e que determina o ponto de início.

Taxa de mutação (μ) A freqüência de mutação em um determinado locus, expressa como mutações por locus por gameta (ou por geração, o que é o mesmo)

Tecnologia do DNA recombinante Tecnologia pela qual uma molécula de DNA é construída *in vitro* a partir de segmentos de mais de uma molécula de DNA parental

Telófase O estágio da divisão celular que começa quando os cromossomos filhos atingem os pólos da célula em divisão e que dura até que as duas células adquiram o aspecto de células interfásicas.

Telomerase Uma ribonucleoproteína de transcriptase reversa que usa seu próprio molde de RNA para adicionar hexâmeros espécie-específicos (tal como TTAGGG em humanos) de telômeros.

Telômero A ponta de cada braço cromossômico. As pontas dos telômeros humanos com cópias em tandem da seqüência $(TTAGGG)_n$, que é necessária para a replicação apropriada das pontas cromossômicas.

Tendenciosidade de averiguação A diferença na probabilidade de que os parentes afetados de indivíduos afetados sejam identificadas, comparada com parentes similarmente afetados de controles. Uma possível fonte de erro nos estudos familiares

Teorema binomial Quando existem duas classes de alternativas, uma com a probabilidade p e a outra com a probabilidade $1 - p = q$, a freqüência de combinações possíveis de p e q em uma série de tentativas é $(p + q)^n$.

Terapia gênica (terapia de transferência gênica) O tratamento de uma doença pela introdução de seqüências de DNA que terão um benefício terapêutico.

Teratógeno Um agente que produz malformações congênitas ou aumenta sua incidência.

Tipo selvagem Um termo usado para indicar o alelo normal (em geral representado por +) ou o fenótipo normal.

Tradução A síntese de um polipeptídeo a partir de um molde de mRNA.

Transcrição A síntese de uma única molécula de RNA unifilamentar a partir de um molde de DNA no núcleo celular, catalisada pela RNA polimerase.

Transcriptase reversa Uma enzima, DNA polimerase dependente de RNA, que catalisa a síntese de DNA em um molde de RNA.

Transcrito primário O transcrito inicial não-processado de RNA de um gene que é colinear com o DNA genômico, contendo íntrons bem como éxons

Transfecção Transferência de um gene para uma célula, possibilitando que a célula transfectada forme um novo produto gênico.

Transferência de Southern Uma técnica, criada pelo bioquímico inglês Ed Southern, para a preparação de um filtro para o qual o DNA foi transferido, seguindo uma digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel para separar as moléculas de DNA pelo tamanho. Moléculas específicas de DNA podem então ser detectadas no filtro por sua hibridização a sondas marcadas.

Transferência northern Uma técnica análoga à transferência de Southern, para detecção de moléculas de RNA por hibridização a uma sonda complementar de DNA.

Transferência western Uma técnica análoga à transferência de Southern, usada para a detecção de proteínas, geralmente por métodos imunológicos.

Transformação Um fenômeno no qual algumas linhagens celulares, tais como células cancerosas, são capazes de crescer indefinidamente em cultura.

Translocação A transferência de segmento cromossômico de um cromossomo para outro. Se dois cromossomos homólogos trocam pedaços, a translocação é *recíproca*. Ver também *translocação robertsoniana*.

Translocação recíproca Ver *translocação*.

Translocação robertsoniana Uma translocação entre dois cromossomos acrocêntricos por fusão no centrômero ou perto dele, com perda dos braços curtos.

Translocação X; autossomo Uma translocação recíproca entre um cromossomo X e um autossomo.

Translucência nucal Um achado ultra-sonográfico de um espaço livre de eco entre a pele e o tecido mole que recobre a coluna cervical no tecido subcutâneo do pescoço fetal. Associada à aneuploidia fetal.

Transmissão de homem para homem Um padrão de herança de uma característica de um pai para todos os seus filhos e nenhuma de suas filhas (também chamada de herança *holândrica*).

Transversão Uma mutação causada pela substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa.

Triagem de soro materno Teste laboratorial baseado em dosar os níveis de determinadas substâncias, tais como a alfa-fetoproteína, a gonadotrofina coriônica humana e o estriol não-conjugado, no sangue de uma mulher grávida para triar fetos afetados por determinadas trissomias ou com defeitos de tubo neural.

Triagem genética Teste com base populacional para identificar indivíduos em risco de desenvolver ou de transmitir um distúrbio específico.

Triplóide Uma célula com três cópias de cada cromossomo ou um indivíduo feito de tais células.

Trissomia O estado de ter três representantes de um determinado cromossomo em vez do par usual, como na trissomia do 21 (síndrome de Down).

tRNA RNA transportador; ver *RNA*.

Troca entre cromátides irmãs A troca de segmentos de DNA entre cromátides irmãs, seja no estágio de quatro filamentos da meiose ou na mitose. Ocorre com freqüência particularmente alta em pacientes com síndrome de Bloom.

Ultra-sonografia Uma técnica na qual ondas de som de alta freqüência são usadas para examinar estruturas internas do corpo; útil no diagnóstico pré-natal.

Valor lod Um método estatístico que testa dados marcadores genéticos em famílias para determinar se dois loci estão ligados. O valor lod é o logaritmo das chances (*odds*) a favor da ligação. Por convenção, um valor lod de 3 (chances de 1.000:1 a favor) é aceito como prova de ligação, e um valor lod de −2 (100:1 contra), como prova de que os loci não estão ligados.

Vetor Em genética molecular, a molécula de DNA na qual foi clonado um gene ou fragmento de DNA capaz de se replicar em um hospedeiro específico e, portanto, replicar o segmento de DNA clonado. Os vetores incluem os plasmídeos, o bacteriófago lambda, os cosmídeos e tanto os cromossomos artificiais de leveduras quanto os bacterianos.

VNTR (número variável de repetições em tandem) Um tipo de polimorfismo de DNA criado por uma disposição em tandem de múltiplas cópias de seqüências curtas de DNA. Altamente polimórfico, usado em estudos de ligação e no "*fingerprinting*" de DNA para testes de paternidade e medicina forense.

Zigosidade O número de zigotos dos quais se deriva um múltiplo nascimento. Por exemplo, os gêmeos podem ser monozigóticos (MZ) ou dizigóticos (DZ). Determinar se um determinado par de gêmeos é MZ ou DZ é determinar sua zigosidade.

Zigoto Um ovócito fertilizado.

Respostas dos Problemas

Capítulo 2 Bases Cromossômicas da Hereditariedade

1. (a) *A* e *a* (b) i. Na meiose I. ii. Na meiose II.
2. Não-disjunção meiótica
3. $(1/2)^{23} \times (1/2)^{23}$; você seria uma mulher.
4. (a) 23; 46. (b) 23; 23. (c) Na fertilização; na fase S do próximo ciclo celular.

Capítulo 3 O Genoma Humano: Estrutura e Função dos Genes e Cromossomos

1. Existem várias seqüências possíveis devido à redundância do código genético. Uma seqüência possível da dupla hélice de DNA é
   5′ AAA AGA CAT CAT TAT CTA 3′
   3′ TTT TCT GTA GTA ATA GAT 5′
   A RNA polimerase "lê" o filamento inferior (3′ para 5′). A seqüência do mRNA resultante seria
   5′ AAA AGA CAU CAU UAU CUA 3′.
   Os mutantes representam os seguintes tipos de mutações:
   Mutante 1: substituição de um nucleotídeo no 5.° códon; por exemplo, UAU → UGU.
   Mutante 2: mudança de matriz de leitura, deleção no 1.° nucleotídeo do 3.° códon.
   Mutante 3: mudança de matriz de leitura, inserção de G entre o 1.° e o 2.° códons.
   Mutante 4: deleção *in frame* de três códons (nove nucleotídeos), começando na 3.ª base.
2. Os cromossomos contêm cromatina, consistindo em nucleossomos. Os cromossomos contêm bandas G que contêm vários milhares de kb de pares de DNA (ou vários milhões de pares de bases) e centenas de genes, cada um contendo (em geral) tanto íntrons quanto éxons. Os éxons são uma série de códons, cada um com três pares de bases de tamanho.
3. O cromossomo 5 contém cerca de 200 milhões de pares de bases de DNA e aproximadamente 3.000 genes. A banda 5p15 tem cerca de 1/10 a 1/15 do tamanho total do cromossomo e, portanto, pode-se estimar que contenha cerca de 10 a 20 milhões de pares de bases do DNA e aproximadamente 200 genes. Muito embora estas estimativas sejam grosseiras, o conceito que é importante compreender é que as bandas cromossômicas contêm potencialmente uma ordem de centenas de genes.
4. As mutações em íntrons podem influenciar o processamento do RNA, levando, assim, a um mRNA anormalmente recomposto (ver Cap. 11). As seqüências *Alu* ou L1 podem estar envolvidas em eventos de recombinação anormal entre cópias diferentes da repetição, deletando ou rearranjando genes. As repetições L1 também podem se transpor ativamente no genoma, potencialmente se inserindo em um gene funcional e perturbando seu funcionamento normal. As regiões controladoras de locus (LCR) influenciam a expressão adequada dos genes no tempo e no espaço; a deleção de LCR pode, assim, perturbar a expressão normal de um gene(s) (ver Cap. 11). Os pseudogenes são, em geral, cópias não-funcionais de genes. Assim, na maioria dos casos, não se esperaria que as mutações em um pseudogene contribuíssem para uma doença.

Capítulo 4 Ferramentas da Genética Molecular Humana

1. (a) A transferência de Southern ou a reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA obtido de amostras de vilosidade coriônica ou amostra de células do líquido amniótico. Em ambos os casos, a transferência de Southern ou a PCR de outro locus deve ser feita simultaneamente, para garantir que a falta de sinal de hibridização (transferência de Southern) ou produto amplificado (PCR) foi causada pela deleção e não por dificuldades técnicas com a amostra de DNA ou o procedimento usado. (b) Transferência Northern. (c) Análise de oligonucleotídeos alelo-específicos de um produto de PCR que inclua o segmento de DNA que contém a mudança de base. Se a mudança de base cria ou destrói um sítio de reconhecimento de enzima de restrição, você pode usar a digestão de restrição do produto de PCR que inclui o segmento que contém a mutação para determinar se a mutação está presente.
2. A principal vantagem da PCR é que é necessário muito menos DNA para análise do que o necessário para a transferência de Southern. Além disso, a PCR é mais rápida e mais barata. As desvantagens potenciais incluem o fato de que a PCR pode "ver" apenas trechos relativamente pequenos do DNA genômico (em cada processo), enquanto a transferência de Southern pode "examinar" um gene inteiro. A PCR também

é muito mais sensível à contaminação por DNA exógeno. Em comparação com as dosagens bioquímicas, a PCR tem a mesma vantagem da velocidade. Entretanto, embora as dosagens bioquímicas possam detectar uma gama de mutações em um locus (incluindo qualquer mutação desconhecida que interfira na atividade enzimática), a PCR é menos adequada para examinar mutações específicas conhecidas.

3. Todas, exceto as hemácias. Entretanto, mesmo as amostras de hemácias ou soro podem conter DNA suficiente de leucócitos contaminantes para que o teste possa ser feito por PCR, pois a PCR é muito sensível.
4. Estabelece o gene responsável por um determinado distúrbio; cria a oportunidade de determinar a base molecular de um distúrbio, por meio de ampla pesquisa laboratorial; fornece instrumentos imediatos para diagnóstico e informação genética; pode ser usado para criar uma terapia de reposição gênica.
5. Começaria com a biblioteca de cDNA porque o cDNA imediatamente forneceria uma sonda que poderia ser usada para a análise Northern examinar a quantidade e o tamanho do mRNA do paciente, bem como a análise de Southern de todos os éxons no DNA obtidos dos pacientes. Uma vez tendo o cDNA, a pesquisa nos bancos eletrônicos de dados de seqüência genômica humana daria os limites éxon/íntron. Isto permitiria a criação de *primers* de PCR flanqueadores de todos os éxons, para amplificar cada éxon e o limite íntron/éxon para procurar pequenas mutações.
6. (a) Uma transição C → T convertendo um códon de arginina em um de fim, resultando em término prematuro. (b) Os oligonucleotídeos 2, 3 e 4 seriam úteis. O oligonucleotídeo 1 é específico da seqüência mutante, mas o pareamento errado com a seqüência normal ocorreria da base seguinte até a última. Seria muito difícil estabelecer condições de hibridização tais que este oligonucleotídeo se hibridizasse de modo estável à seqüência mutante, mas não à normal. O oligonucleotídeo 2 é específico para a seqüência normal. Colocando a base que está mutada no centro, é fácil criar condições para que este oligonucleotídeo forme um dúplex estável com a seqüência normal, mas não com a mutante. O oligonucleotídeo 3 é específico para a seqüência mutante e seria um excelente discriminador entre as seqüências normal e mutante. O oligonucleotídeo 4 é específico para a seqüência mutante, mas se hibridizaria ao filamento complementar ao mostrado aqui e serviria para discriminar o normal do mutante. O oligonucleotídeo 5 é muito pequeno para criar condições que permitam a discriminação entre a seqüência normal e a mutante.

Capítulo 5 Padrões de Herança Monogênica

1. (b) Autossômica recessiva; 1/4. (c) Cerca de 1/180, cerca de 10 vezes o risco populacional. (d) Calvin e Cathy são heterozigotos obrigatórios. Sendo eles primos em primeiro grau, também é muito provável que tenham herdado seu alelo mutante através de Betty e Barbara do mesmo avô. Assim, é muito provável que Betty e Barbara sejam portadoras, mas isso não é obrigatório. Teoricamente, é possível que Cathy tenha herdado seu alelo de CF de Bob e que Calvin o tenha herdado de seu pai, o marido de Barbara. Os testes baseados em DNA responderão definitivamente à questão.
2. (a) Heterozigotos em cada um dos dois loci; por exemplo, *A/a B/b*. (b) Os genitores (Gilbert e Gisele; Horace e Hedy) são todos homozigotos para o *mesmo* alelo recessivo para surdez congênita.
3. Expressividade variável — d; Dissomia uniparental — i; Consangüinidade — j; Endogamia — c; Herança dominante ligada ao X — g; Mutação nova — e; Heterogeneidade alélica — h; Heterogeneidade de locus — a; Homozigose para uma característica autossômica dominante — b; Pleiotropia — f.
4. (b) Eles são homozigotos. (c) 100%; virtualmente zero se seu parceiro não for afetado. (d) 50%; virtualmente zero se seu parente não for afetado.
5. Todas as possíveis exceto (c), que é improvável se os genitores forem totalmente não-afetados.
6. (a) Mutação nova. (b) Taxa de mutação. (c) Taxa de mutação. (d) 50%.

Capítulo 6 Variação Genética em Indivíduos: Mutação e Polimorfismo

1. Supondo 40 anos como sendo uma geração, 41 mutações/9 milhões de alelos = $4{,}55 \times 10^{-6}$. A estimativa baseia-se em suposições de que os casos avaliados resultem de mutação nova, de que a doença seja totalmente penetrante, de que todos os novos mutantes sejam nativivos (e avaliados) e de que só haja um locus no qual as mutações possam levar à aniridia. Se existirem vários loci, então a taxa estimada é muito alta. Se algumas mutações não forem avaliadas (por falta de penetrância ou morte no útero), a taxa estimada pode ser muito baixa.
2. (a) Um polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição ligado ao X. (b) Se o polimorfismo for decorrente de uma mutação de ponto, então as pessoas com genótipos diferentes terão padrões indistinguíveis com uma enzima de restrição diferente. Entretanto, se o polimorfismo for decorrente de uma deleção/inserção de 2 kb, então o mesmo polimorfismo deverá ser detectado com qualquer enzima de restrição que corte em qualquer lado da deleção/inserção.
3. Um modo de determinar isto é inverter a pergunta e indagar que proporção de indivíduos seria de *homozigotos*. Então a proporção dos que são heterozigotos é 1 menos a proporção dos que são homozigotos. Para cada alelo, a freqüência de homozigotos seria de $0{,}20 \times 0{,}20$, ou 0,04. Assim, $5 \times 0{,}04$, ou 20%, de indivíduos seriam homozigotos para o alelo 1 OR alelo 2 OR ... alelo 5. Portanto, 80% dos indivíduos seriam heterozigotos neste locus.
4. Sim, maior durante as gestações subseqüentes. A doença pode ser evitada usando-se anticorpos a Rh-D (RhoGAM) para limpar a circulação materna de células sanguíneas Rh-positivas antes que elas provoquem uma resposta imune primária. Se o homem fosse também Rh-negativo, a criança teria que ser Rh negativo, e não ocorreria doença hemolítica.

Capítulo 7 Variação Genética em Populações

1. (a) *a*, 0,1; *A*, 0,9. (b) Mesma. (c) $(0{,}18)^2$.
2. (a) 0,02. (b) $(0{,}04)^2$ ou cerca de 1 em 600 (homozigotos não se reproduzem). (c) 0,0004. (d) 1/4.
3. Apenas (d) está em equilíbrio. A seleção a favor ou contra determinados genótipos; casamento não-aleatório; migração recente.

4. (a) Abby tem 2/3 de chance de ser portadora. Andrew tem uma chance de cerca de 1/150 de ser portador. Portanto, seu risco de ter um filho afetado é de 2/3 × 1/150 × 1/4, ou 1/900. (b) 2/3 × 1/4 × 1/4 = 1/24. (c) 2/3 × 1/22 × 1/4 = 1/132; 2/3 × 1/4 × 1/4 = 1/24.

5. (a) Retinoblastoma, q = 1/50.000, $2pq$ = 1/25.000; ataxia de Friedreich, q = 1/158, $2pq$ = 1/79; coroideremia, q = 1/25.000, $2pq$ = 1/12.500. (b) Os distúrbios autossômicos dominantes e ligados ao X aumentariam rapidamente, em uma geração, para atingir um novo balanço; os autossômicos recessivos aumentariam também, mas muito lentamente, pois a grande maioria de alelos mutantes não está sujeita a seleção.

6. Aproximadamente 1/26 e 1/316.

7. Como a alta incidência em Quebec parece ser decorrente de um efeito do fundador, a maioria ou todos os casos são descendentes de um ou mais ancestrais fundadores. Assim, os alelos mutantes devem ser relativamente homogêneos. Para a distrofia muscular Duchenne, como uma grande proporção de casos em cada geração é o resultado de uma mutação nova, os alelos mutantes presentes na população estão em heterozigose. O daltonismo é relativamente comum e não é um letal genético. Assim, muitos alelos mutantes estão presentes na população.

Capítulo 8 **Mapeamento Gênico e o Projeto do Genoma Humano**

1. Os loci *HD* e *MNSs* estão mapeados distantes no cromossomo 4 e, portanto, não estão ligados, muito embora sejam sintênicos.

2. Para a doença de Huntington, sim, pois todas as evidências sugerem que apenas uma ou no máximo algumas pré-mutações são responsáveis por todos os casos; as pré-mutações, como resultado, apenas alguns haplótipos, com expansões CAG que estão acima da média normal mas ainda dentro da faixa normal, contribuem para a maioria dos alelos expandidos relacionados a doenças. Para a neurofibromatose tipo 1, esperamos que não exista desequilíbrio de ligação porque aproximadamente metade de todos os casos resultam de mutações novas, que ocorrem em uma variedade de haplótipos diferentes.

3. O fragmento 1 está presente nos híbridos II, III, IV e VII, mas ausente nos híbridos I, V, VI e VIII. O fragmento 2 não pode ser mapeado, pois um fragmento de camundongo do mesmo tamanho está presente em todos os híbridos, e os fragmentos humanos e de camundongo não podem ser diferenciados. O fragmento 1 do gene *Q* está mapeado no cromossomo 7.

4. Os valores lod indicam que este polimorfismo está proximamente ligado ao gene da doença do rim policístico. O pico do valor lod, 25,85, ocorre a 5 cM. As chances a favor da ligação a esta distância comparadas a nenhuma ligação são de $10^{25,85}:1$ (i. e., quase $10^{26}:1$). Os dados no segundo estudo indicam que *não há* ligação entre o gene da doença e o polimorfismo nesta família. Assim, há uma heterogeneidade genética neste distúrbio, e a informação de ligação, portanto, só poderá ser usada para diagnóstico se houver evidência prévia de que a doença nesta família em particular é ligada ao polimorfismo.

5. A catarata de Coppock parece co-segregar com o haplótipo "A". Não há crossings. Deve-se fazer uma análise completa de valor lod. Além disso, podemos examinar o gene de cristalina gama quanto a mutações nas pessoas afetadas.

6. A fase na mãe provavelmente é *B/WAS*, de acordo com o genótipo do menino afetado. Esta fase pode ser determinada com apenas 95% de certeza, pois há 5% de chance de que um crossing tenha ocorrido na meiose, levando ao menino afetado. Com base nesta informação, há uma chance de (0,95 × 0,95) + (0,05 × 0,05) de que o feto (que é masculino) seja *não-afetado*.

7. Este resultado surpreendente (supondo-se que a paternidade seja a informada) indica que a mãe herdou o alelo *A* (e o alelo *WAS*) de sua mãe, isto é, sua fase é *A/WAS*, e não *B/WAS*, como se supôs na questão 6. Assim, deve ter havido um crossing na meiose que levou ao menino afetado. Para confirmar isto, devemos examinar polimorfismos em ambos os lados dele no cromossomo X para ter certeza de que os padrões de segregação são compatíveis com um crossing. Com base nesta nova informação, agora há 95% de chance de que o feto da atual gestação *seja afetado*.

8. Esta questão é para uma discussão aberta. Conhecer a posição de mapa pode sugerir genes candidatos para um distúrbio que está mapeado no mesmo local. Conhecer a posição de mapa pode permitir a detecção de portadores ou o diagnóstico pré-natal por marcadores ligados. Uma comparação entre o mapa humano e de camundongo nesta região pode indicar possíveis modelos animais para a doença.

9. A região ao redor de *HPRT* é sempre mantida devido à seleção usada. Portanto, não pode ser mapeada por métodos de híbridos de radiação que são baseados em *HPRT*. O uso de outro marcador selecionável, tal como a timidina cinase no cromossomo 17, permitiria o mapeamento de híbrido de radiação do cromossomo X distal ao redor de *HPRT*.

Capítulo 9 **Fundamentos de Citogenética Clínica**

1. (a) Quarenta e seis cromossomos, homem; um dos cromossomos 18s tem um braço longo mais curto que o normal. (b) Para determinar se a anomalia é *de novo* ou herdada de um genitor balanceado portador. (c) Quarenta e seis cromossomos, homem, apenas um 7 normal e um 18 normal, mais uma translocação recíproca entre os cromossomos 7 e 18. Este é um cariótipo balanceado. Quanto ao pareamento meiótico e à segregação, ver o texto, particularmente a Fig. 9.12. (d) O cromossomo $18q^-$ é o cromossomo der(18) translocado, 18pter → 18q12::7q35 → 7qter. O cariótipo do menino não é balanceado; ele é monossômico para o braço longo distal do 18 e é trissômico para o braço longo distal do 7. Admitindo que o genoma humano contém aproximadamente 50.000 genes, poderíamos prever que o menino é monossômico ou trissômico para algumas centenas de genes.

2. (a) Cerca de 95%. (b) Sem aumento de risco.

3. Não-disjunção pós-zigótica, em uma divisão inicial da mitose. Embora não se possa prever o curso clínico com total precisão, é provável que ela seja afetada de um modo um pouco menos grave do que se fosse uma criança trissômica do 21 sem mosaicismo.

4. (a) Fenótipo anormal, a menos que o marcador seja excepcionalmente pequeno e restrito apenas às próprias seqüências

centroméricas. Os gametas podem ser normais ou anormais; é indicado o diagnóstico pré-natal. (b) Fenótipo anormal (trissomia do 13, ver Cap. 10); não se reproduzirá. (c) Fenótipo anormal no probando e aproximadamente 50% da prole. (d) Fenótipo normal, mas risco de prole não-balanceada (ver texto). (e) Fenótipo normal, mas risco de prole não-balanceada (ver texto).

5. (a) Não indicado. (b) Cariotipagem fetal indicada. Particularmente risco de trissomia do 21. (c) Cariótipo indicado para a criança para determinar síndrome de Down por trissomia ou por translocação. Se for translocação, é indicada a cariotipagem dos pais. (d) Não indicado, a menos que outros achados clínicos possam sugerir uma síndrome de genes contíguos. (e) Cariótipo indicado para excluir, nos meninos, uma deleção ou outra anomalia cromossômica. Se os achados clínicos indicarem a possibilidade de retardo mental por X frágil, seria indicado um teste diagnóstico específico de DNA.

Capítulo 10 Citogenética Clínica: Distúrbios dos Autossomos e Cromossomos Sexuais

1. Teoricamente, gametas X e XX em iguais proporções; prole esperada XX, XY, XXX e XXY.
2. (a) Determinar se a presença de um distúrbio recessivo ligado ao X na menina é devido a um defeito cromossômico, tal como uma translocação X; autossomo ou uma síndrome de Turner 45,X; é devido à presença de uma condição (tal como insensibilidade androgênica) que gere um fenótipo feminino em uma pessoa XY; ou à homozigose ou inativação não-aleatória do X em uma pessoa 46,XX. Ver texto. (b) A quebra perturba uma cópia do gene de hemofilia A (*F8*), enquanto o X normal, como é usual neste tipo de translocação, é preferencialmente inativado na maioria ou em todas as células. Ver a Fig. 10.16.
3. Não. O XYY só pode resultar de não-disjunção na meiose II paterna, enquanto o XXY pode resultar de não-disjunção na meiose I no homem ou em qualquer das divisões na mulher.
4. Translocação do material do cromossomo Y contendo a região determinante do sexo (e o gene *SRY*) para o cromossomo X ou para um autossomo.
5. 46,XY; insensibilidade androgênica (feminização testicular); a mãe ou o filho podem resultar de uma mutação *de novo*, mas se a mãe é heterozigota, aplica-se o risco usual ligado ao X.
6. 46,XX; autossômica recessiva; é possível o diagnóstico pré-natal; é necessária uma atenção clínica no período neonatal para determinar o sexo e deter as crises de perda de sal.
7. (a) Nenhum; os braços curtos de todos os cromossomos acrocêntricos são tidos como idênticos e contêm múltiplas cópias de genes de rRNA. (b) Nenhum, se a deleção envolve apenas a heterocromatina (Yq12). Uma deleção mais proximal pode deletar genes importantes para a espermatogênese (ver Fig. 10.9) (c) Síndrome do *cri du chat*, e a gravidade dependerá da quantidade de DNA deletado. (d) Síndrome de Turner; o cromossomo Xq^- é preferencialmente inativado em todas as células (desde que o centro de inativação do X não seja deletado), reduzindo, assim, o potencial de gravidade de tal deleção.

   Partes diferentes do genoma contêm densidades diferentes de genes. Assim, a deleção da mesma quantidade de DNA em cromossomos diferentes pode deletar um grande número de genes diferentes, levando, então, a expectativas fenotípicas diferentes
8. Questão para discussão. Ver o texto para possíveis explicações.
9. (a) Em geral é dado o risco de 1%, mas o risco provavelmente não é maior que o populacional relativo à idade. (b) O risco relativo à idade é maior que 1%. (c) Sem aumento de risco, se a sobrinha com síndrome de Down tiver trissomia do 21. Mas se a sobrinha tiver translocação robertsoniana, então o consulente pode ser portador e ter alto risco. (d) De 10% a 15%. Ver o texto. (e) Apenas uns poucos por cento. Ver o texto. O risco relativo à idade da mulher pode ser relevante.

Capítulo 11 Fundamentos das Doenças Moleculares: Lições das Hemoglobinopatias

1. O heredograma deve conter as seguintes informações: (a) A hidropisia fetal deve-se a uma ausência total de cadeias α. (b) Os genitores devem ter cada um o genótipo $\alpha\alpha$/--. (c) O genótipo α - é muito comum em algumas populações, incluindo os melanésios. Genitores com este genótipo não podem transmitir um genótipo --/-- para sua prole.
2. Exceto em populações isoladas, os pacientes com β-talassemia em geral são compostos genéticos porque normalmente existem muitos alelos presentes em uma população na qual é comum a β-talassemia. Em tais populações, a chance de que um paciente seja um verdadeiro homozigoto para um só alelo é maior do que em uma população na qual a talassemia é rara. Neste último grupo, mais "mutações privadas" devem ser esperadas (aquelas que são encontradas apenas — ou quase apenas—em um único heredograma). É mais provável que um paciente tenha alelos idênticos se ele pertencer a um isolado geográfico com alta freqüência de um único ou de alguns alelos, ou se seus genitores forem consangüíneos. Ver texto no Cap. 7.
3. Três bandas na transferência de RNA poderiam indicar, entre outras possibilidades, que (a) um alelo está produzindo dois mRNAs, um de tamanho normal e o outro anormal, e o outro alelo está produzindo um mRNA de tamanho anormal; (b) ambos os alelos estão fazendo um transcrito de tamanho normal e um transcrito anormal, mas os anormais são de tamanhos diferentes; ou (c) um alelo está produzindo três mRNAs de tamanhos diferentes e o outro alelo não está fazendo transcritos.

   O cenário (c) é altamente improvável, se é que possível. Dois mRNAs de um alelo só podem resultar de um defeito de processamento que permite que seja feito um mRNA normal, mas com eficiência reduzida, enquanto leva à síntese de outro transcrito de tamanho anormal que resulta ou da incorporação de seqüências íntron no mRNA ou da perda de seqüências éxon do mRNA. No caso, a outra banda anormal vem do outro alelo. Uma banda maior do outro alelo pode resultar de um defeito de recomposição ou de uma inserção, enquanto uma banda menor pode ser decorrente de um defeito de recomposição ou de uma deleção. A Hb E é causada por um alelo a partir do qual são feitos tanto um transcrito normal quanto um encurtado (ver Fig. 11.14); o mRNA normal constitui até 40% do mRNA total de β-globina, produzindo apenas uma anemia branda.

4. Existem duas mutações que afetam cadeias diferentes de globina. A prole esperada é 1/4 normal, 1/4 Hb M Saskatoon heterozigota com metemoglobinemia, 1/4 Hb M Boston heterozigotos com metemoglobinemia e 1/4 de heterozigotos duplos com quatro tipos de Hb: normal, ambos os tipos de Hb M e um tipo com anomalias em ambas as cadeias. Nos heterozigotos duplos, as conseqüências clínicas são desconhecidas, provavelmente uma metemoglobinemia mais severa.
5. $2/3 \times 2/3 \times 1/4 = 1/9$.
6. 1/4.
7. 8, 1, 2, 7, 10, 4, 9, 5, 6 e 3.
8. As exceções a esta regra podem surgir, por exemplo, de mutações em sítios de corte que levam à recomposição errada de um éxon. O éxon pode ser excluído do mRNA, gerando ou uma deleção na sequência da proteína ou causando uma mudança na matriz de leitura, que leva à inclusão de aminoácidos diferentes na seqüência da proteína.
9. Tre-Lis-Leu-Ala-Fen-Leu-Leu-Ser-Asn-Fen-Tir-Fim.

Capítulo 12 A Base Molecular e Bioquímica das Doenças Genéticas

1. Três tipos de mutações que podem explicar uma proteína mutante que é 50 kD maior que o polipeptídeo normal são os seguintes: (a) Uma mutação no códon finalizador normal que permite que a tradução continue. (b) Uma mutação de recomposição que resulta na inclusão de seqüências íntron na região codificante. As seqüências íntron teriam que ser livres de códons finalizadores para permitir os 50 kD extras da tradução. (c) Uma inserção, com uma matriz de leitura aberta, na seqüência codificante. Para qualquer uma delas, aproximadamente 500 aminoácidos extras seriam adicionados à proteína se o peso molecular médio de um aminoácido for de cerca de 100. Quinhentos aminoácidos seriam codificados por 1.500 nucleotídeos.
2. Uma substituição de nucleotídeo que troca um aminoácido por outro deve ser chamada de *mutação hipotética* e, possivelmente, um *polimorfismo*, a menos (a) que tenha sido demonstrado por uma dosagem funcional da proteína que a mudança impede o funcionamento em um grau compatível com o fenótipo do paciente ou (b) em vez de — ou em adição a — uma dosagem funcional, possa ser demonstrado que a mudança de nucleotídeo é encontrada *apenas* nos cromossomos mutantes, que podem ser identificados pela análise de haplótipo de pacientes e seus genitores, e *não* em cromossomos normais nesta população. O fato de a mudança de nucleotídeo ser observada apenas raramente na população normal e ser encontrada com uma freqüência significativamente maior em uma população mutante é uma forte evidência de apoio, mas não uma prova, de que a substituição é uma mutação.
3. Se Johnny tem fibrose cística (CF), as chances são de cerca de $0{,}85 \times 0{,}85$, ou 70%, de que ele tenha uma mutação previamente descrita que pode ser identificada de imediato pela análise de DNA. Seus genitores são do nordeste da Europa. Portanto, a probabilidade de que ele seja homozigoto para uma mutação ΔF508 é de $0{,}7 \times 0{,}7$, ou 50%, pois cerca de 70% dos que têm CF no nordeste da Europa têm esta mutação. Se ele não tiver a mutação ΔF508, ele certamente ainda pode ter CF, pois cerca de 30% dos alelos (pelo menos nesta população européia) não são ΔF508. As etapas para o diagnóstico de CF incluem o seguinte: (a) procurar diretamente a mutação ΔF508. Se não estiver presente, (b) procurar outras mutações que sejam mais prováveis; (c) procurar então diretamente outras mutações baseadas em probabilidades sugeridas pelos dados de haplótipo; (d) se todos os esforços para identificar uma mutação falharem (ou se o tempo não permitir), fazer análise de ligação com marcadores polimórficos de DNA proximamente ligados à CF.
4. James pode ter uma nova mutação no cromossomo X porque Joe herdou o mesmo cromossomo X de sua mãe e a deleção não estava presente nem na mãe nem em Joe. Se for este o caso, não há risco de recorrência. Alternativamente, a mãe pode ser um mosaico, e o mosaicismo inclui sua linhagem germinativa. Neste caso, há um risco definitivo de que o X mutante possa ter sido herdado por outro filho ou passado a uma filha portadora. Cerca de 5% a 15% dos casos deste tipo parecem se dever a mosaicismo de linhagem germinativa materna. Logo, o risco é de metade deste valor para sua prole masculina, pois a chance de que um filho herde o X mutante é de $1/2 \times 5$ a $15\% = 2{,}5$ a $7{,}5\%$.
5. Para a DMD, como uma doença recessiva clássica ligada ao X que é letal nos homens, prevê-se que um terço dos casos seja de mutações novas. O grande tamanho do gene provavelmente explica a alta taxa de mutação neste locus (é um grande alvo para a mutação). É improvável que a origem étnica do paciente tenha algum efeito em um destes fenômenos, embora existam algumas evidências de que o espectro de mutações (mutações de ponto *versus* deleções) possa diferir entre grupos étnicos diferentes.
6. O número limitado de aminoácidos que foi observado substituindo glicina nos colágenos mutantes reflete a natureza do código genético. Substituições de um nucleotídeo nas três posições dos códons de glicina permite apenas um número limitado de mutações de sentido trocado. Ver Quadro 3.1.
7. Duas bandas de G6PD na eletroforese de um lisado (ver Quadro 12.8) indicam que a mulher tem um alelo diferente de *G6PD* em cada cromossomo X e que cada alelo está sendo expresso em sua população de hemácias. Entretanto, nenhuma célula isolada expressa ambos os alelos, devido à inativação do X. Os homens têm apenas um cromossomo X e, portanto, expressam apenas o alelo de *G6PD*. Uma mulher com duas bandas pode ter dois alelos normais com mobilidade eletroforética diferente, um alelo normal e um alelo mutante com mobilidade eletroforética diferente ou dois alelos mutantes com mobilidade eletroforética diferente. Como os dois alelos comuns de deficiência (A^- e B^-) migram para a mesma posição, como os alelos de atividade normal comum (*A* e *B*), é improvável que a mulher tenha um alelo comum de deficiência em ambos os loci. Além disso, não podemos dizer muito sobre o possível significado patológico das duas bandas sem dosar a atividade enzimática. Se um dos alelos tem baixa atividade, então ela deve ter risco de hemólise a ponto de o alelo de alta atividade ser inativado em conseqüência da inativação do X.
8. O boxe no Cap. 12 chamado "Deficiências Enzimáticas e Doença" mostra as possíveis causas da perda de múltiplas atividades enzimáticas: (a) Elas podem compartilhar um cofator cuja síntese ou transporte seja defeituoso. (b) Elas podem compartilhar uma subunidade codificada por um gene mutante. (c) Elas podem ser processadas por uma enzima

comum cuja atividade seja crucial para se tornar ativa. (d) Elas podem normalmente estar situadas na mesma organela, e um defeito nos processos biológicos da organela pode afetar todas as quatro enzimas. Por exemplo, elas podem não ser importadas normalmente para a organela e podem ser degradadas no citoplasma. Quase todas as enzimopatias são recessivas (ver texto), e a maioria dos genes é autossômica.

9. Haploinsuficiência. Assim, em algumas situações, as contribuições de ambos os alelos são necessárias para fornecer uma quantidade suficiente de proteína para evitar a doença. Um exemplo é dado pelos heterozigotos portadores de deficiência de receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL).

10. Esta situação é bem ilustrada por doenças decorrentes de mutações no mtDNA ou no genoma nuclear que prejudicam o funcionamento do complexo de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Absolutamente todas as células têm mitocôndrias, e a OXPHOS ocorre em quase todas as células, embora os defeitos na OXPHOS danifiquem apenas um subgrupo de órgãos, particularmente o sistema neuromuscular com sua alta demanda de energia.

11. Um exemplo é a fenilcetonúria, na qual o retardo mental é o único efeito patológico significativo da deficiência de fenilalanina hidroxilase, que é encontrada não no cérebro, mas apenas no fígado e nos rins, órgãos que não são afetados por este defeito bioquímico. A hipercolesterolemia decorrente de deficiência de receptor de LDL é outro exemplo. Embora o receptor de LDL seja encontrado em muitos tipos de células, a deficiência hepática dele é primariamente responsável pelo aumento dos níveis de LDL-colesterol no sangue.

12. Existem duas características que definem estes alelos: (1) a atividade de hex A que eles codificam está suficientemente reduzida para permitir sua detecção nos testes de triagem (quando o outro alelo é uma mutação comum de Tay-Sachs sem nenhuma atividade); (2) sua atividade de hex A, entretanto, é adequada para evitar o acúmulo do substrato natural (gangliosídeo G_{M2}). Provavelmente existem apenas algumas substituições na proteína hex A que reduziriam a atividade apenas em um modesto grau (sem prejudicar mais substancialmente a proteína). Assim, a região dos aminoácidos 247-249 parece ser relativamente tolerante a substituições, ou pelo menos de Trp por Arg. As substituições que alteram de forma mais grave a carga ou o volume dos aminoácidos desta posição podem muito bem ser alelos causadores de doença.

Capítulo 13 O Tratamento das Doenças Genéticas

1. Os pacientes que não respondem podem ter mutações que prejudicam drasticamente a síntese de um produto gênico funcional. Os que respondem podem ter mutações na região reguladora do gene. Os efeitos destas mutações podem ser contrabalançados pela administração de intérferon-γ (IFN-γ). Estas mutações podem ser no sítio de ligação do DNA que responde ao estímulo de IFN ou em algum outro elemento regulador que participe da resposta a IFN-γ. Alternativamente, os pacientes responsivos podem produzir um polipeptídeo de citocromo-*b* defeituoso que conserva um pequeno grau de função residual. A produção de mais desta proteína mutante, em resposta a IFN-γ, aumenta a atividade de oxidase pouco, mas significativamente.

2. Uma enzima que normalmente é intracelular pode funcionar de modo extracelular se o substrato estiver em equilíbrio entre os líquidos intra- e extracelular e se o produto não for essencial dentro da célula ou em um estado de equilíbrio similar. Assim, as enzimas com substratos e produtos que não se ajustem a estes critérios não serão adequadas a esta estratégia. Este enfoque pode não funcionar para a fenilalanina hidroxilase por causa de sua necessidade de tetraidrobiopterina. Entretanto, se a tetraidrobiopterina puder se difundir livremente pelo polietileno glicol ao redor da enzima, a administração oral de tetraidrobiopterina pode ser suficiente. Esta estratégia não funcionaria para doenças de armazenamento porque o substrato da enzima está preso dentro do lisossomo. Na síndrome de Lesch-Nyhan, o processo patológico mais importante está no cérebro, e a enzima no líquido extracelular não seria capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. A doença de Tay-Sachs não pode ser tratada deste modo por causa da não-difusibilidade do substrato pelo lisossomo.

3. As mutações de Rhonda impedem a produção de qualquer receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Assim, a combinação de uma resina ligadora de ácidos biliares e uma droga (p. ex., lovastatina) para inibir a síntese de colesterol não teria efeito em aumentar a síntese de receptores de LDL. O menino deve ter um ou dois alelos mutantes que produzem um receptor com alguma função residual, e a expressão aumentada destes receptores mutantes na superfície do hepatócito reduz o colesterol ligado a LDL do plasma.

4. Os pacientes não-responsivos provavelmente têm alelos que não fazem nenhuma proteína, que diminuem sua quantidade intracelular de algum outro modo (p. ex., fazem uma proteína instável) ou que perturbam a conformação da proteína de tal maneira que seu sítio de ligação de piridoxal-fosfato não tem afinidade pelo co-fator mesmo em altas concentrações. A resposta para a segunda parte da questão é menos direta. A resposta dada aqui é baseada na generalização de que a maioria dos pacientes com uma doença autossômica recessiva rara provavelmente tem dois alelos diferentes, o que sugere que não existem pontos quentes mutacionais no gene, que os pacientes não descendem de um "fundador" e não são membros de um grupo étnico no qual a doença tenha uma alta freqüência. Neste contexto, (a) Tom provavelmente tem dois alelos que são responsivos; (b) os primos em primeiro grau com a mesma doença recessiva provavelmente compartilham apenas um alelo, de modo que é provável que Allan tenha um alelo responsivo que ele compartilha com Tom e outro que é ou não-responsivo ou que responde de modo mais fraco ao co-fator que o outro alelo de Tom.

5. (a) Você precisa tanto de um promotor que permita a síntese de níveis suficientes de mRNA no tecido-alvo de escolha quanto do cDNA de fenilalanina hidroxilase. Na realidade, você também precisa de um vetor para levar o "gene" para a célula, mas este aspecto do problema não foi muito tratado no texto. (b) Um gene de fenilalanina hidroxilase provavelmente será efetivo em qualquer tecido que tenha um bom suprimento de sangue para o transporte da fenilalanina e uma fonte adequada do co-fator da enzima, a tetraidrobiopterina. O promotor teria que ser capaz de efetuar a transcrição no tecido-alvo escolhido para o tratamento. (c) Qualquer mutação que reduza gravemente a quantidade da proteína na célu-

la, mas que não tenha efeito na transcrição. Este grupo inclui as mutações que prejudicam a tradução ou que tornam a proteína altamente instável. As talassemias incluem exemplos de todos estes tipos. (d) As células hepáticas são capazes de produzir tetraidrobiopterina, enquanto outras células podem não ser. A célula-alvo para a transferência gênica deve, portanto, ser capaz de fazer este co-fator. De outro modo, a enzima não funcionaria, a menos que o co-fator fosse administrado em grandes quantidades. (e) A fenilalanina hidroxilase humana existe como um homodímero ou homotrímero. Nas proteínas cujos alelos produzem um polipeptídeo mutante (*versus* nenhum), estes alelos podem manifestar um efeito dominante negativo no produto do gene transferido. Este efeito pode ser superado criando-se um gene que produza mais fenilalanina hidroxilase normal (diluindo, assim, o efeito do polipeptídeo mutante) ou transferindo-se o gene para um tipo de célula que normalmente não expressa a fenilalanina hidroxilase e que, portanto, não estaria sujeito ao efeito dominante negativo.

Capítulo 14 Genética do Sistema Imune

1. Associação significa que um *determinado alelo* (HLA-B27) é encontrado com mais freqüência em pacientes com a doença do que se poderia esperar a partir de sua freqüência alélica na população. Ligação significa que dois *loci*, o locus de *HLA-B* e o gene que codifica a enzima 21-hidroxilase, estão situados perto um do outro no cromossomo, de modo que a freqüência de recombinação entre eles é menor que 50%. Que alelos estão presentes nos dois loci é irrelevante para se eles estão ligados ou não.
2. (a) 1, gêmeos monozigóticos; 2, irmãos ou gêmeos dizigóticos; 3, pai, mãe; 4, meio-irmão; 5, primo em primeiro grau; 6, pessoa não-aparentada. (b) O órgão de um gêmeo monozigótico pode ser geneticamente suscetível ao mesmo problema que levou ao receptor precisar de um transplante.
3. Envolve o corte e o rearranjo do DNA genômico, enquanto a remoção dos íntrons e reunião dos éxons envolve o RNA.
4. Devido à exclusão alélica, a expressão é de apenas um dos dois alelos em cada célula. Quanto a isto, é mais similar a expressão dos genes ligados ao X, embora os mecanismos de exclusão alélica e inativação do X sejam bem diferentes. Para a maioria dos outros loci autossômicos, que não os conhecidos como sofrendo *imprinting* genômico, ambos os alelos são expressos.
5. A inativação não-aleatória supostamente reflete a sobrevida diferencial das duas populações de células (com um ou o outro X ativo) nas linhagens de células B ou T. As células com o gene mutante no X ativo supostamente estão em grande desvantagem seletiva na linhagem na qual o produto gênico em particular tem um papel. Assim, apenas as células com o alelo normal no X ativo sobrevivem. Para as formas autossômicas, a inativação do X supostamente é aleatória, pois ambos os tipos de populações de células têm produtos gênicos ligados ao X igualmente funcionais.

Capítulo 15 Genética dos Distúrbios com Herança Complexa

1. (a) Autossômica dominante com penetrância reduzida. Se fosse de fato multifatorial, o risco para parentes mais distantes cairia em mais de 50%. (b) Na doença dominante, você não esperaria um aumento de risco após uma pessoa afetada ter tido dois filhos afetados, enquanto na herança multifatorial o risco após dois filhos afetados seria maior que após apenas um afetado porque, com dois afetados, há uma probabilidade maior de que os pais sejam portadores de uma carga significativa de alelos de predisposição em vários loci; ver o texto.
2. A transmissão de homem para homem descarta a ligação ao X. Outros critérios de herança multifatorial podem ser examinados, como no texto.
3. Para uma herança autossômica recessiva, mas não para uma multifatorial, quase não há chance de que um genitor seja afetado. Para outros critérios, ver o texto.

Capítulo 16 Genética e Câncer

1. História familiar, exame cuidadoso das retinas de ambos os genitores, análise citogenética, se o tumor estiver associado a outras malformações, e identificação da mutação. Alertar os genitores quanto ao risco, mas destacar que a futura criança poderia ser examinada imediatamente após o nascimento e em curtos intervalos por algum tempo para ter certeza de que se houver desenvolvimento de tumor ele será detectado e tratado de pronto. Os genitores devem ser informados sobre o risco da doença em gestações subseqüentes, a disponibilidade de diagnóstico pré-natal e o impacto da doença, caso reincida.
2. O câncer colorretal parece necessitar de várias mutações seqüenciais em vários genes, um processo que pode demorar mais que uma (no hereditário) ou duas (no esporádico) mutações no gene de retinoblastoma. A dependência de idade também reflete o número, a época e a quantidade de divisões celulares nas células do cólon e nos retinoblastos.
3. Uma linhagem celular com i(17q) é monossômica para 17p e trissômica para 17q. Assim, a formação do isocromossomo leva à perda de heterozigose para genes em 17p. Isto pode ser particularmente importante se um ou mais genes supressores tumorais (tais como *TP53*) estiverem presentes em 17p. Além disso, vários proto-oncogenes estão mapeados em 17q. É possível que o aumento de sua dosagem possa conferir uma vantagem de crescimento nas células que contêm o i(17q).
4. A principal preocupação é a necessidade de reduzir a exposição à radiação ao nível mais baixo possível devido ao risco de câncer nas crianças com este defeito genético.
5. Embora a maioria (> 95%) dos cânceres de mama pareça seguir uma herança multifatorial, existem dois genes conhecidos (*BRCA1* e *BRCA2*) e pelo menos outro locus suspeito (*BRCA3*) nos quais as mutações causam câncer de mama autossômico dominante antes da menopausa, que pode ser bilateral. Os dados de risco empírico são compatíveis com um modelo geral multifatorial com mistura de formas dominantes da doença com uma penetrância um pouco reduzida do tempo de vida. A detecção direta da mutação poderia ser feita, caso desejado, pelos probandos nas famílias de Wanda e Wilma, e, se a mutação fosse encontrada em *BRCA1* ou *BRCA2*, poderia ser oferecido um teste direto para o risco de câncer em seus parentes.

Capítulo 17 Aspectos Genéticos do Desenvolvimento

1. Especificação e determinação. As células que sofreram especificação irão, quando explantadas, se desenvolver do mesmo modo que o fariam se tivessem se desenvolvido no embrião, mas, se transplantadas, são competentes para um desenvolvimento dependente de posição e adotarão o destino da região na qual ocorreu o transplante. Uma vez determinado, um tecido embrionário seguirá seu programa de desenvolvimento independente de para onde é transplantado.
2. A-3, B-2, C-4, D-1.
3. Um sinal parácrino é uma substância difundível liberada de um grupo de células que induz uma resposta de um grupo de células vizinhas. Um morfógeno é um tipo especializado de sinal parácrino que opera ao longo de um gradiente, ativando diferentes programas de desenvolvimento dependendo da concentração do morfógeno recebido pelas células vizinhas
4. A-4, B-3, C-5, D-2, E-1.
5. Células T ou B maduras que rearranjaram somaticamente seus receptores de célula T ou loci de imunoglobulina. Esta mudança não é epigenética; é uma alteração permanente da própria seqüência de DNA. Os animais derivados de um único núcleo de uma célula T ou B madura são incapazes de montar uma resposta imune apropriadamente ampla.
6. Considere aspectos de regulação *versus* simples capacidade de efetuar uma reação bioquímica. Considere também os efeitos dominantes negativos dos fatores de transcrição, levando em conta a freqüente natureza binária de tais fatores (ligação ao DNA e domínios de ativação)

Capítulo 18 Diagnóstico Pré-natal

1. c, e, f, j, d, h, g, b, i e a.
2. Não, a criança pode ter apenas síndrome de Down ou monossomia do 21, que quase sempre é letal. Assim, eles devem receber informações e considerar outras alternativas para ter um filho.
3. Não, o problema pode ser contaminação com células maternas.
4. O nível de alfa-fetoproteína no soro materno (MSAFP) está tipicamente elevado quando o feto tem um defeito de tubo neural aberto. Os níveis de MSAFP e estriol não-conjugado em geral estão reduzidos e a gonadotrofina coriônica humana geralmente está elevada quando o feto tem síndrome de Down.
5. (a) Cai rapidamente a zero; muito pouco efeito. (b) Cai rapidamente ao nível mantido por novas mutações (cerca de metade). (c) Cai rapidamente ao nível mantido por novas mutações (muito baixo).
6. (a) Cerca de 15% (ver Quadro 9.5). (b) Pelo menos 50% são cromossomicamente anormais. (c) Não, o diagnóstico pré-natal ou a cariotipagem dos genitores seria indicada apenas após três destes abortos, desde que não existam outras indicações, tais como idade materna avançada.
7. (a) Sim. A fase pode ser determinada pela análise de seu pai, que transmitiu um cromossomo X normal para a mulher. (b) Sim. Se um feto masculino receber o X da avó paterna, ele não será afetado. Se receber o X da avó materna, ele será afetado. Isto, logicamente, supondo-se que não tenha havido recombinação no cromossomo transmitido e sem mosaicismo gonadal no avô. (c) Análise de deleção.
8. Questão para discussão. Ver o texto para os exemplos e para discussão.

Capítulo 19 Informação Genética e Avaliação de Risco

1. (a) Risco *a priori* 1/4; risco *a posteriori* (dois irmãos normais) 1/10. (b) Zero.
2. (a) Primeiro, restrinja sua atenção e os cálculos de probabilidade condicional às mulheres para as quais temos informação sobre a probabilidade condicional que pode alterar seu risco de ser portadora. Estas pessoas são: Lucy, que tem um neto afetado e dois não-afetados; sua filha, Molly, que tem um filho afetado; e Martha, que tem dois filhos não afetados. Maud não contribui com nenhuma informação adicional porque não tem filhos. Desenhe um heredograma abreviado (ver abaixo) e calcule todas as possíveis probabilidades *a priori*.

A priori
Mutação nova em Nathan = μ

A priori
Mutação nova em Molly = 2μ

Condicional
Nathan herdou = ½

A priori
Lucy ser portadora = 4μ

Condicional
Molly herdou = ½
Nathan herdou = ½
Martha não herdou = ½

A priori
Lucy ser portadora = 4μ

Condicional
Molly herdou = ½
Nathan herdou = ½
Martha herdou = ½
Dois meninos não afetados = ½ ½

Conjunta = μ | Conjunta = $2\mu/2 = \mu$ | Conjunta = $4\mu/8 = \mu/2$ | Conjunta = $4\mu/32 = \mu/8$

	Ambos São Portadores	Não São Ambos Portadores
Risco *a priori* para Ira e Margie	4/9	5/9
Probabilidade condicional (3 filhos normais)	$(3/4)^3$	1
Probabilidade conjunta	$4/9 \times (3/4)^3 = 3/16 = 0{,}19$	$5/9 = 0{,}56$
Probabilidade *a posteriori*	$0{,}19/(0{,}19 + 0{,}56) = \sim 1/4$	$0{,}56/0{,}75 = \sim 3/4$

(Este enfoque ao cálculo da probabilidade bayesiana é claramente descrito e explicado em Hodge S. E. [1998], A simple, unified approach to bayesian risk calculations. J. Genet Counseling 7:235-262.)

Em *A*, Nathan é uma mutação nova com probabilidade μ.

Em *B*, Molly é uma mutação nova, mas como Lucy NÃO é portadora, Molly só pode ter uma mutação nova e não herdou a mutação, logo sua probabilidade *a priori* é 2μ (NÃO 4μ), porque a mutação nova pode ter ocorrido tanto no cromossomo X paterno quanto no materno.

Em *C*, Lucy é portadora. Como mostrado antes no boxe do capítulo que descreve o cálculo da probabilidade de que qualquer mulher seja portadora de um distúrbio letal ligado ao X, a probabilidade *a priori* de Lucy $= 4\mu$. Molly herdou o gene mutante, mas Martha não, logo a probabilidade de que seus dois filhos não sejam afetados é essencialmente 1.

Em *D*, Lucy é portadora, assim como Molly, mas Martha também, e ela não passou seu gene mutante para seus dois filhos.

(Não consideramos as outras combinações de estados portadores porque são tão improváveis que podem ser ignoradas. Por exemplo, a possibilidade de que Lucy seja portadora da mutação mas Molly não a herde e que Nathan seja *outra* mutação nova é extremamente pequena, pois a probabilidade conjunta de tal evento iria requerer DUAS mutações novas e conteria μ^2 termos na probabilidade conjunta que são muito pequenas para contribuir para a probabilidade *a posteriori*.)

As probabilidades condicionais podem então ser calculadas a partir destas várias uniões.

Para Molly, ela é portadora nas situações *B*, *C* e *D*, logo sua

$$\text{probabilidade } a\ posteriori \text{ de ser uma portadora} = \frac{\mu + \mu/2 + \mu/8}{\mu + \mu + \mu/2 + \mu/8} = 13/21$$

Similarmente, a mãe de Molly, Lucy, 5/21; Norma e Nancy, 13/42; Olive e Odette, 13/84; Martha, 1/21; Nora e Nellie, 1/42; Maud, 5/42; Naomi, 5/84.

(b) Para ter um risco de 2% de ter um filho afetado, uma mulher deve ter uma chance de 8% de ser portadora; logo, Martha, Nora e Nellie não se enquadrariam, pois seu risco de ser portadora é menor que 8%

3. $(1/2)^{13}$; $(1/2)^{13} \times 2$. (O 2 surge porque esta é a chance de 13 nascimentos masculinos consecutivos *ou* 13 nascimentos femininos consecutivos, antes do nascimento de qualquer criança); 1/2. A probabilidade de que nasça um menino é de 1/2 para cada gestação, independente de quantos meninos tenham nascido anteriormente (supondo-se que exista uma segregação cromossômica direta e nenhuma anomalia no desenvolvimento sexual que possa alterar a segregação subjacente de 50% a 50% de cromossomos X e Y durante a espermatogênese).

4. (a) Use a primeira equação, $I = \mu + 1/2\ H$ para resolver H e a substitua por H na segunda equação, $H = 2\mu + 1/2\ H + If$, resolva I, $I = 3\mu/(1-f)$. Substituindo f por 0,7, dá $I = 10\mu$; $H = 18\mu$;

	Portadora	Não-Portadora
A priori	18μ	$1 - 18\mu = \sim 1$
Condicional	1/2	μ
Conjunta	9μ	μ
A posteriori	$9\mu/(9\mu + \mu) = 0{,}9$	$\mu/(9\mu + \mu) = 0{,}1$

90%; 45%.

(b) 3μ; 4μ. (c) 0,147

5. Coluna B

f Consulente
h 2/3
g Heterozigota obrigatória
e Probabilidade *a priori*
d Mutação sem sentido no gene da fibrose cística
b Detecção direta de uma mutação por transferência de Southern
i Família informativa
a 4μ
j Parente em primeiro grau
c Análise de ligação

6. (a) O risco *a priori* de que Ira ou Margie seja portadora de fibrose cística é de 2/3; portanto, a probabilidade de que ambas sejam portadoras é de $2/3 \times 2/3 = 4/9$. (b) Seu risco de ter um filho afetado em qualquer gestação é de $1/4 \times 4/9 = 1/9$. (c) A análise bayesiana é feita como anteriormente:

Logo, a chance de que o próximo filho de Ira e Margie seja afetado é de $1/4 \times 1/4 = 1/16$.

7. A probabilidade *a priori* da criança ser portadora de um gene mutante de distrofia miotônica é de 1/2. Caso se suponha que ele tem uma chance de 1/2 de ser assintomático, mesmo que porte o gene mutante, então sua chance de possuí-lo e apresentar os sintomas é de 1/3. O teste é uma questão complexa. Muitos acham que testar uma criança assintomática para uma doença incurável com início na vida adulta é impróprio, pois a criança deve tomar esta decisão por si mesma (ver o Cap. 20).

8. (a) Sim, autossômica recessiva, autossômica dominante (mutação nova), recessiva ligada ao X, distúrbio cromossômico ou multifatorial. (b) Isto aumenta a suspeita de que o distúrbio seja autossômico recessivo. (c) Este fato certamente apóia a probabilidade de que o problema tenha uma explicação genética. O padrão de heredograma seria compatível com herança autossômica recessiva apenas se o marido da irmã tivesse o mesmo defeito (possível se ele for da mesma cidade,

por exemplo). Deve-se considerar um padrão recessivo ligado ao X (particularmente se todas as crianças afetadas forem meninos) ou um defeito cromossômico. A mãe e seu filho devem ter uma avaliação genética apropriada dos achados clínicos, tais como cariótipo, análise de X frágil etc.

9. A mulher está enganada. Ela tem um risco de 1/2 de transmitir o gene mutante *NF1* para sua prole. O fato de ela ter uma nova mutação apenas reduz o risco de recorrência em outra parte da família.

Capítulo 20 **Genética e Sociedade**

1. A primeira consideração é testar um menino para uma doença incurável. Como o menino tem sintomas e a família está procurando um diagnóstico, esta situação *não* é igual àquela descrita no problema 7 do Cap. 19, na qual uma criança assintomática está sendo considerada para um teste de distrofia miotônica. Entretanto, como a doença de Huntington em uma criança resulta da expansão de trinucleotídeo por uma grande repetição em um dos genitores, em geral o pai, encontrar uma expansão muito aumentada na criança automaticamente levanta a possibilidade de que um dos genitores, provavelmente o pai, seja portador da repetição que está aumentada o suficiente para causar a doença de Huntington de início na vida adulta. Assim, testando a criança, podemos inadvertidamente descobrir algo sobre o risco dos genitores. O teste deve ser feito, portanto, apenas após o consentimento informado dos genitores. Outros aspectos: (a) se um dos genitores tiver o gene *HD*, o que você faria quanto a testar o filho mais velho assintomático? (b) Nenhum dos genitores atualmente é sintomático; e se nenhum dos genitores tiver o alelo *HD* expandido, mas a criança sintomática tiver um alelo expandido?

2. As perguntas a considerar na formulação de sua resposta são as seguintes: (a) Considere os benefícios de evitar a doença por saber o genótipo do neonato no locus de β-globina. O fato de conhecer o genótipo pode evitar a sepse pneumocócica? Outras complicações da anemia falciforme? (b) Compare e contraste como a triagem da anemia falciforme foi introduzida *versus* a triagem de portador de Tay-Sachs com relação ao envolvimento da comunidade e liderança. (c) Diferencie os homozigotos *SS* dos heterozigotos *AS*. Que prejuízo pode resultar da identificação das pessoas *SS* e *AS*? O que a identificação de um neonato com *SS* ou *AS* lhe diz sobre os genótipos dos genitores e os riscos genéticos da futura prole dos genitores?

3. Para justificar uma triagem, temos que mostrar que o benefício obtido pela triagem supera os danos. Considere a questão da autonomia, pois implícito ao ato de informar a família que seu filho tem uma anomalia cromossômica está o fato de que a criança não pode decidir se deseja fazer o teste mais tarde em sua vida. Temos que considerar que, como anomalias na aprendizagem e no comportamento ocorrem em algumas pessoas com anomalias de cromossomos sexuais, pode ser benéfico informar os pais e indicar uma educação e intervenção psicológica antes que surjam problemas maiores. Há também, entretanto, uma preocupação sobre "a profecia da consumação", de que dizer aos pais que pode haver um problema aumenta o risco de que venha a haver um problema, pela mudança das atitudes dos pais em relação à criança. Há uma grande quantidade de publicações sobre este tema que você deveria investigar e ler.

   Veja, por exemplo:

Bender B. G., Harmon R. J., Linden M. G., Robinson A. (1995) Psychosocial adaptation of 39 adolescents with sex chromosome abnormalities. Pediatrics 96 (2 Pt 1):302-308.

Puck M. H. (1981) Some considerations bearing on the doctrine of self-fulfilling prophecy in sex chromosome aneuploidy. Am J Med Genet 9:129-137.

Robinson A., Bender B. G., Borelli J. B., *et al* (1986) Sex chromosomal aneuploidy: Prospective and longitudinal studies. Birth Defects Orig Art Ser 22:23-71.

4. Os fatores a se considerar são a incidência, que afetará o custo por positivo verdadeiro descoberto, a facilidade ou a dificuldade de fazer o diagnóstico se não for instituído um programa de triagem formal, o malefício e o custo que ocorreriam se as crianças surdas não fossem reconhecidas até que não conseguissem desenvolver a linguagem verbal, a eficácia do tratamento para as crianças identificadas pela triagem neonatal e a oportunidade de dar informação genética quanto aos riscos de recorrência para os pais. Com uma incidência de perda auditiva neurossensorial bilateral de 1/350 a 1/500, "O programa universal de triagem auditiva neonatal é factível, benéfico e justificável, conforme indicado pela freqüência da doença, a precisão dos testes de triagem, a capacidade de intervir bem precocemente, os bons resultados atribuíveis à amplificação bem cedo e a recuperação de todos os custos da triagem na prevenção de futuros custos de intervenção" (Mehl A. L., Thomson V [1998] Newborn hearing screening: The great omission. Pediatrics 101:E4). De fato, a triagem de neonatos para surdez é obrigatória em 10 estados dos EUA desde 1999. Por outro lado, as pessoas surdas podem ter uma visão diferente da situação, pois algumas pessoas na comunidade surda não encaram a surdez como uma incapacidade a ser corrigida, mas sim como uma variação que ajuda a definir sua cultura. Estima-se que 50% da surdez grave congênita neurosenssorial seja atribuível a causas genéticas na família, em geral formas autossômicas recessivas de surdez. Que implicações e obrigações, se é que alguma, um teste positivo de surdez cria para os estados pagarem uma informação genética?

Índice Alfabético

E

F

G

H

I

N

O

P

Q

R